
分类号：TS201.1

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2210510111

外源油菜素内酯调控青稞种子萌发的生理代谢及褪黑
素富集机理研究

PHYSIOLOGICAL METABOLISM AND
MELATONIN ENRICHMENT MECHANISM OF
BARLEY SEED GERMINATION REGULATED BY
EXOGENOUS BRASSINOLIDE

学生姓名： 李峥宏

指导老师： 张国强（教授）

专 业： 食品科学与工程

研究方向： 食品生物技术

论文答辩日期： 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：李峰岳

日期：2024 年 6 月 3 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：

李峰岩

指导教师签名：

张国立

日期：2024 年 6 月 3 日

日期：2024 年 6 月 3 日

外源油菜素内酯调控青稞种子萌发的生理代谢及褪黑素富集机理研究

摘 要

青稞作为我国青藏高原地区的标志性农作物，其营养价值及产业价值近年来开始备受学者关注。研究表明，青稞籽粒中含有丰富的褪黑素。褪黑素作为一种普遍存在于动植物中的吲哚类化合物，其在调节动植物生理代谢方面扮演着重要的角色。在植物中，它在调节植物生长发育以及保护植物免受各种生物及非生物胁迫的损害方面发挥着重要的作用，这一点与植物激素所发挥的作用类似，并且一些植物激素例如赤霉素、乙烯、脱落酸等于褪黑素之间的串扰关系已经得到了证实。油菜素内酯（BRs）作为上世纪末期被发现的新一类植物激素，其在促进调节植物发育方面的作用受到了广泛的研究，但目前有关油菜素内酯调控植物中褪黑素富集作用的相关研究还鲜有报道。因此，本实验以青稞为材料，重点研究了油菜素内酯对青稞种子萌发的生理代谢的影响及褪黑素富集的机理，结果如下：

（1）油菜素内酯、赤霉素和乙烯均能促进青稞幼苗的生长以及调控青稞幼苗中褪黑素的富集，但油菜素内酯对于青稞幼苗中褪黑素富集效果最好，在第3天时达到最大，为 19.42 ± 0.33 ng/g，是对照组（CK， 14.42 ± 0.18 ng/g）的1.34倍、是种子（ 11.46 ± 0.15 ng/g）的1.69倍。

(2) 油菜素内酯 (BRs) 在不同的浓度下, 对萌发青稞中 β -葡聚糖、 γ -氨基丁酸、总酚、总黄酮、总淀粉以及丙二醛的含量具有明显的影响。其中 100 μmol 的 BRs 能够促进青稞中 β -葡聚糖含量的提高; 200 μmol 的 BRs 能够显著促进 GABA(γ -氨基丁酸)的积累; 100 μmol 的 BRs 能够促进青稞幼苗中总酚以及总黄酮的积累; 此外, BRs 还能抑制淀粉的分解, 以及抑制青稞幼苗在萌发过程中丙二醛的产生。

(3) 通过转录组测序, 分析了三组 (BR:油菜素内酯处理组; C: 无菌水处理组; S: 种子对照组) 样本中的差异基因。三组中 BR 与 C 差异表达基因共有 3675 个、BR 与 S 差异表达基因共有 26001 个、C 与 S 组差异表达基因 26753 个。富集分析的结果显示, BR 与 C 组主要富集到光合作用, 光收集、有机化合物氧化的能量衍生、细胞呼吸等过程; BR 与 S 组的差异基因主要富集到苯丙酮的生物合成、黄酮类化合物的生物合成等过程; C 与 S 组差异基因主要富集到苯丙氨酸的生物合成、淀粉和蔗糖代谢等过程。分析了与褪黑素生物合成有关的差异基因表达情况, 发现有 10 个差异表达基因在青稞种子萌发过程中通过调控 L-色氨酸脱羧酶、芳基烷基胺 N-乙酰转移酶以及乙酰羟色胺 O-甲基转移酶的活性来富集褪黑素, 1 个差异表达基因通过响应油菜素内酯作用来上调乙酰血清素 O-甲基转移酶的活性, 来实现青稞幼苗中褪黑素的富集。

关键词: 青稞; 褪黑素; 油菜素内酯; 生理代谢; 转录组

**Physiological metabolism and melatonin enrichment
mechanism of barley seed germination regulated by
exogenous brassinolide**

ABSTRACT

As a landmark crop in the Tibetan Plateau region of China, the nutritional and industrial value of barley has begun to attract the attention of scholars in recent years. Studies have shown that barley seeds are rich in melatonin. Melatonin, as a kind of indole compound commonly found in plants and animals, plays an important role in regulating the physiological metabolism of plants and animals. In plants, it plays an important role in regulating plant growth and development as well as protecting plants from various biotic and abiotic stresses, which is similar to that of plant hormones, and the crosstalk between some plant hormones, such as gibberellin, ethylene, abscisic acid, and melatonin, has been demonstrated. Nowadays, the role of brassinolide (BRs) in promoting the regulation of plant development has been widely studied. However, there are nearly no studies related to the role of brassinolide in regulating melatonin enrichment in plants. Therefore, this experiment took barley as the material, and focused on the study of oleuropein lactone on the physiological metabolism of barley seed germination and the mechanism

of melatonin enrichment to study and analyze, the results are as follows:

(1) Brassinolide, gibberellin and ethylene could promote the growth of barley seedlings as well as regulate melatonin enrichment in barley seedlings, but brassinolide had the best effect on melatonin enrichment in barley seedlings, which reached a maximum of 19.42 ± 0.33 ng/g at the third day, which was 1.34 times higher than that of the control (CK, 14.42 ± 0.18 ng/g) and 1.69 times higher than that of the seed (11.46 ± 0.15 ng/g) by 1.69 times.

(2) The content of β -glucan, γ -aminobutyric acid, total phenols, total flavonoids, total starch and malondialdehyde in sprouted barley was significantly affected by different concentrations of brassinolide (BRs). Among them, 100 μ mol of BRs could promote the increase of β -glucan content in barley; 200 μ mol of BRs could significantly promote the accumulation of GABA; 100 μ mol of BRs could promote the accumulation of total phenolics and total flavonoids; in addition, BRs could inhibit the decomposition of starch, and had a certain inhibitory effect on the production of malondialdehyde.

(3) Transcriptome sequencing was employed to analyse differential genes in three groups of samples: BR (oleuropein lactone-treated), C (sterile water-treated), and S (seed control). A total of 3675 differentially expressed genes were identified between BR and C, 26001 between BR and S, and 26753 between C and S. The results of the enrichment analysis

indicated that the BR and C groups were primarily enriched for genes involved in photosynthesis, light harvesting, energy derivation for oxidation of organic compounds, and cellular respiration. In contrast, the differential genes of the BR and S groups were primarily enriched for genes involved in phenylacetone biosynthesis and flavonoid biosynthesis. Finally, the differential genes of the C and S groups were primarily enriched for genes involved in phenylpropanoid biosynthesis, starch and sucrose metabolism, and other processes. The expression of differentially expressed genes related to melatonin biosynthesis was analysed, and it was found that 10 differentially expressed genes were enriched for melatonin by regulating the activities of L-tryptophan decarboxylase, arylalkylamine N-acetyltransferase, and acetohydroxytrypt. O-methyltransferase was observed to be active during germination of barley seeds, with one differentially expressed gene being up-regulated in response to the action of oleoresinolide to achieve melatonin enrichment in young barley seedlings. Similarly, activity in response to oleuropein lactone was observed to achieve melatonin enrichment in barley seedlings.

KEYWORDS: qingke; melatonin; brassinolide; physiological metabolism; transcriptome

目录

摘 要	IV
ABSTRACT	VI
第 1 章 绪论	1
1.1 青稞简介	1
1.2 褪黑素研究进展	2
1.2.1 褪黑素	2
1.2.2 植物中褪黑素的生物合成途径	3
1.3 植物激素与褪黑素的相互作用研究进展	4
1.3.1 褪黑素对植物激素的作用	4
1.3.2 植物激素对褪黑素的作用	5
1.4 油菜素内酯的研究现状	6
1.4.1 油菜素内酯简介	6
1.4.1 油菜素内酯的生理功能	6
1.4.2 油菜素内酯与褪黑素的相互作用	8
1.5 转录组学	8
1.5.1 转录组学概述	8
1.5.2 转录组学在植物领域的应用	9
1.5.3 转录组学在植物褪黑素中的应用	9
1.6 研究内容及目的意义	10
1.6.1 研究内容	10
1.6.2 研究目的及意义	10
第 2 章 不同植物激素处理对萌发青稞褪黑素富集的影响	12
2.1 前言	12
2.2 实验材料与方法	13
2.2.1 实验材料	13
2.2.2 实验试剂	13
2.2.3 实验设备	14
2.2.4 实验方法	14

2.2.4.1 油菜素内酯处理	14
2.2.4.2 赤霉素处理	14
2.2.4.3 乙烯处理	14
2.2.4.5 青稞籽粒萌发生理指标的测定	15
2.2.4.6 青稞种子褪黑素含量的测定	15
2.2.5 数据统计及分析	15
2.3 结果及分析	15
2.3.1 油菜素内酯对萌发青稞中褪黑素含量的影响	15
2.3.2 乙烯对萌发青稞中褪黑素含量影响	18
2.3.2 赤霉素对萌发青稞中褪黑素含量影响	21
2.4 本章小结	24
第 3 章 外源油菜素内酯对萌发青稞生理代谢的影响	25
3.1 前言	25
3.2 实验材料与方法	25
3.2.1 实验试剂	26
3.2.2 实验设备及仪器	26
3.2.3 实验方法	27
3.2.3.1 油菜素内酯处理	27
3.2.3.2 样品液的提取	27
3.2.3.2 支链淀粉与直链淀粉含量的测定	27
3.2.3.3 总黄酮含量的测定	27
3.2.3.4 总酚含量的测定	28
3.2.3.5 β -葡聚糖含量的测定	28
3.2.3.6 γ -氨基丁酸 (GABA) 含量的测定	28
3.2.3.7 丙二醛 (MDA) 含量的测定	28
3.2.4 数据与分析	28
3.3 结果与分析	28
3.3.1 油菜素内酯对萌发青稞中 β -葡聚糖含量的影响	28
3.3.2 油菜素内酯对萌发青稞中 GABA 含量的影响	30

3.3.3 油菜素内酯对萌发青稞中总黄酮含量的影响	31
3.3.4 油菜素内酯对萌发青稞中总酚含量的影响	32
3.3.5 油菜素内酯对萌发青稞中总淀粉含量的影响	33
3.3.6 油菜素内酯对萌发青稞中丙二醛（MDA）含量的影响	34
3.4 本章小结	36
第 4 章 外源油菜素内酯影响青稞褪黑素富集的转录组分析	37
4.1 前言	37
4.2 材料与方法	37
4.2.1 实验材料	37
4.2.2 实验设计	37
4.2.3 RNA 提取和文库构建	37
4.2.4 上机测序	38
4.3 转录组数据统计与分析	38
4.3.1 数据质控	38
4.3.2 转录本组装及预测	39
4.3.3 对基因表达水平进行定量	39
4.3.4 差异基因的筛选及分析	39
4.3.5 数据处理	39
4.4 结果与分析	39
4.4.1 转录组测序质量控制与组装结果分析	39
4.4.2 基因表达定量分析	40
4.4.3 样品相关性分析及主成分分析	41
4.4.4 基因功能注释	43
4.4.5 不同青稞籽粒样本差异表达基因分析	44
4.4.6 差异基因的筛选与分析	45
4.4.7 差异表达基因的 GO 分析	47
4.4.8 差异基因的 KEGG 分析	49
4.4.9 与褪黑素合成相关的差异基因	52
4.5 本章小结	58

第 5 章 结论与展望	60
5.1 结论	60
5.2 创新	61
5.3 展望	61
参考文献	63
攻读硕士学位期间发表的学术论文	75
致谢	76

第 1 章 绪论

1.1 青稞简介

青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudumhook. f.*)，作为禾本科小麦的一个变种之一，由于其在收获时内外颖片与颖果分离的特性而被称为裸大麦或无壳大麦^[1-3]。汉语中称其为“青稞”，而在藏语中则称其为“乃”。根据青稞籽粒的形态以及其含有的淀粉含量，青稞可以被分成二棱青稞、四棱青稞以及六棱青稞。此外，青稞根据其种皮的不同颜色特征可以分成白青稞、黑青稞、蓝青稞以及紫青稞^[4]。在我国，青藏地区主要以种植四棱青稞和六棱青稞为主，其中六棱青稞主要在西藏种植，而四棱青稞主要在青海种植^[5]。青稞是我国青藏高原的标志性作物，其产量能占到西藏农作物产量的 65 % 以上。据数据表明，截止到 2023 年年底，西藏自治区青稞产量已达到 84 万吨，播种面积达 222.87 万亩^[6]。

近几年来，青稞因其丰富的营养价值功能开始广泛受到国内外学者的关注。由于青稞长期在我国高海拔地区（4000 米）生长，抗逆性强、发育早以及适应性广也就成了青稞的特点^[7]。受不同的限制因素如太阳辐射、季节性干旱以及氧气供应有限的影响，青稞中常会生成并积累一系列对人体健康有益的次生代谢物^[8]。这其中就包括了 β -葡聚糖、 γ -氨基丁酸、酚类化合物、维生素 E 以及膳食纤维等功能活性成分^[9]。此外，因为缺乏会对营养成分造成稀释作用的纤维外壳——颖壳，青稞也通常比普通大麦籽粒具有更多的淀粉、蛋白质以及功能性多糖^[10]。因此，青稞也以“高纤维、高蛋白、高维生素、低脂肪、低糖”的营养特征而著称。青稞的这些功能活性成分，使得其在医疗保健等行业具有广泛的应用价值。如： β -葡聚糖具有降血糖、降血脂以及抗肿瘤等功能^[11]；游离的酚类化合物，因其很强的抗氧化性，能够调节人体糖类脂类代谢，预防代谢疾病^[12]；此外，青稞中还含有丰富的褪黑素，其能参与调节动植物中一些重要的生理过程，是一种重要的生物活性物质^[13]。由此看来，作为开发功能性食品的优质原料，青稞的功能性食品市场的开发具有广阔的前景。目前，青稞已经开始从产区向非产区转移，从区域性的口粮食物发展为全球性的健康食品源作物。因此，为满足国家对于高质量食品发展的需求，我们必须重视青稞功能性食品产业的发展。

1.2 褪黑素研究进展

1.2.1 褪黑素

褪黑素是一种广泛存在于动物与植物当中的一种吲哚类化合物。在动物中，褪黑素是由松果体在夜间分泌的，它在调节睡眠-觉醒周期、青春期发育以及季节性适应等方面扮演着关键角色。临床研究的发现进一步证明了褪黑素在多个方面的重要作用，包括保护神经系统、调节运动代谢、调控心血管血压、具有抗肿瘤作用，并且还展现出抗焦虑、抗抑郁等益处。这些发现表明褪黑素在维持整体身体健康和生理平衡方面发挥着重要的功能，为其在医学和治疗领域的潜在应用提供了有力的支持^[14]。褪黑素由于其在多种临床条件下展现出的潜在治疗效果，近年来成为医疗领域的新兴热点。针对与褪黑素受体相互作用的新药的选择性开发，显示出在神经精神疾病和代谢疾病等领域具有广阔的应用前景。这种趋势归因于褪黑素的治疗潜力在临床上的显现，为医学领域带来了新的研究和创新机会^[15]。

而在植物当中，褪黑素除了能够表现出同动物中相同的调节光周期与节律现象之外，它还是植物在受到恶劣环境胁迫时的调节剂。目前的研究表明，当植物遭受干旱、辐射、极端温度和化学应激等环境压力时，植物会增加褪黑素合成基因的表达水平，以增强其自身的抵御能力。这些研究进展揭示了植物在应对外界胁迫和逆境时，褪黑素作为一项重要生理调节机制的作用。通过调控褪黑素的产生，植物能够启动一系列生化反应和信号传递途径，以提高对环境胁迫的适应性^[16]。在植物当中，褪黑素虽然主要参与植物胁迫有关的情形中，但其也参与到植物的萌发、生长、根系的形成、衰老等重要的过程。近年来，已有相当数量的研究表明，植物中褪黑素水平的变化与大多数的植物激素有着密不可分的联系，它们相互作用、相互影响，共同决定着植物的生理生长以及代谢情况^[17]。目前，越来越多的学者已经开始广泛关注褪黑素与植物激素之间的交互作用。研究表明，褪黑素与植物激素在植物生长发育和逆境应答中的相互调控非常重要。这种相互作用对于植物的发育、生理和适应性有着深远的影响，并且在激素的合成、信号传递等过程中扮演着关键角色。因此，进一步了解褪黑素与植物激素之间的串扰作用机制，对于我们深入理解植物内部调节系统、推动农业技术的发展以及品种改良都具有重要意义。这个领域的研究前景非常值得期待，有助于推动植物生物

学的进步并解决农业领域的关键问题。

1.2.2 植物中褪黑素的生物合成途径

植物中褪黑素的合成途径与动物的相似，但也有些许不同。由于植物自身能够合成褪黑素的前体物质色氨酸这一特性，使得其在合成酶、反应顺序以及中间产物与动物合成途径相比存在着一定的差异^[18]。目前，主流的研究观点都认为，植物中褪黑素的生物合成主要通过以下方式进行：色氨酸（Tryptophan）首先借助色氨酸脱羧酶（TDC）转化为色胺（Tryptamine），后通过色胺-5-羟化酶（T5H）羟化生成5-羟色胺（Serotonin）。然后5-羟色胺通过5-羟色胺N-乙酰转移酶（SNAT）转化为N-乙酰5-羟色胺（N-acetylserotonin），或通过N-乙酰5-羟色胺甲基转移酶（ASMT）/咖啡酸O-甲基转移酶（COMT）转化为5-甲氧基色胺（5-methoxytryptamine）。最后，分别在ASMT/COMT以及SNAT的催化反应下，N-乙酰5-羟色胺（）与5-甲氧基色胺（5-methoxytryptamine）被催化生成褪黑素（Melatonin）^[19]。除此之外，部分学者认为，同动物中色氨酸代谢类似，色氨酸也能够通过色氨酸羟化酶（TPH）的作用生成5-羟色氨酸（5-hydroxytryptophan）进而代谢生成褪黑素。Back^[20]和 Zhang 等^[21]在水稻的种子以及根系部位都检测到了5-羟色氨酸，这为色氨酸代谢生成褪黑素提供了一个新的发现。

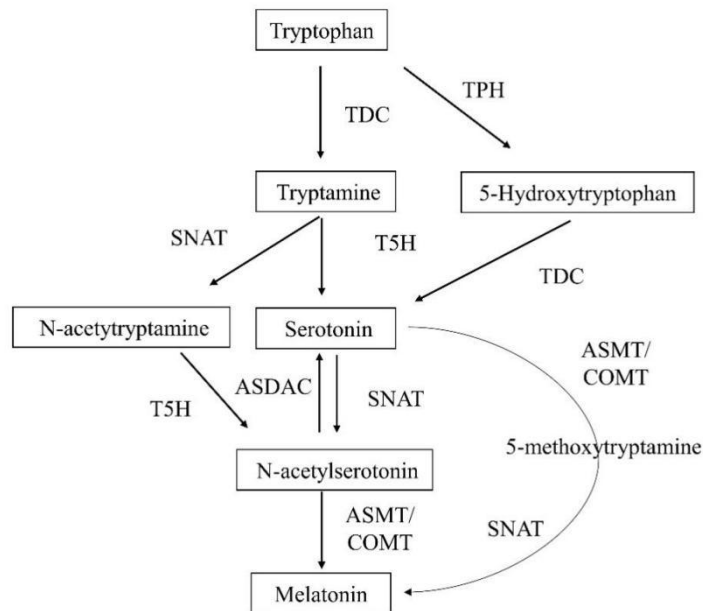


图 1-1 植物体内褪黑素的生物合成途径

Fig.1-1 Biosynthetic pathway of melatonin in plants

注: TDC: 色氨酸脱羧酶; TPH: 色氨酸 5-单氧化酶; SNAT: 5-羟色胺 N-乙酰转移酶; T5H: 色胺-5-羟化酶; COMT: 咖啡酸 O-甲基转移酶; ASDAC: N-乙酰血清素脱乙酰酶

1.3 植物激素与褪黑素的相互作用研究进展

随着研究的深入,褪黑素在植物中的作用范围越来越广。在植物学领域,目前褪黑素被研究最多的作用之一是它在植物面对生物以及非生物胁迫时作为生物调节剂的作用。同样,作为植物生长必不可少的调节剂,植物激素在这方面也起到了相似甚至相同的作用^[22]。而如今越来越多的研究表明,包括生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸等经典植物激素,以及近年新发现的激素如茉莉酸、水杨酸、油菜素内酯、多胺以及独角金内酯^[23]。尽管目前的已经确认了植物激素与褪黑素之间存在着一种或多种相互作用,但是植物激素与褪黑素之间的相互作用及其调节机制仍然存在待解决的问题。其中包括它们在细胞间(可能是自由的或蛋白质辅助的形式)以及组织和器官间(通过木质部和韧皮部)的运输方式,它们可能如何与碳水化合物或氨基酸结合,涉及的信号转导组分,以及可能的植物激素机制共享等方面^[24]。

1.3.1 褪黑素对植物激素的作用

Wei^[25]等人研究了褪黑素与生长素(IAA)之间的关系,他们发现褪黑素能够上调几种参与到 IAA 合成的基因,以及生长素受体编码基因的表达水平,从而来促进大豆当中生长素的生物合成以及信号转导;Wang 等^[26]人发现了褪黑素可通过抑制细胞分裂素的信号转导(AHK4、AHPs 以及 ARR15)来对其产生拮抗作用,从而影响细胞分裂素对根系的应答作用;Lv 等^[27]人研究了褪黑素在拟南芥种子萌发时与赤霉素等激素之间的串扰机制。他们发现赤霉素和褪黑素在调节种子的萌发过程当中表现出拮抗作用。根据 Li 等^[28]人的研究,他们发现通过向脱落酸合成缺失的大麦突变体喷施外源褪黑素可以增强大麦的抗寒性。褪黑素通过调节大麦中脱落酸的含量以及抗氧化系统的活性来实现这一效果。除了以上传统的植物激素外,我们也能找到关于新型植物激素与褪黑素的相关性案例。如 Luo 等^[29]研究发现,外源性的褪黑素通过影响几个与茉莉酸生物合成(LOX1.5 和 LOX2.1)、木质素含量、渗透物质以及转录因子(HY5 和 MYB86)相关的基因的表达,从而来增强小麦在苗期和成熟期的抗寒性;袁瑞敏等^[30]研究了褪黑素通过调控沙果中的水杨酸和乙烯的水平来达到维持沙果品质的效果。实时实时荧光定量

PCR 的结果表明,褪黑素显著影响了与水杨酸合成的两个相关基因(MdPAL、MdICS2)的表达,这为褪黑素与水杨酸的相互作用关系提供了理论支撑;Yang 等^[31]人发现,褪黑素处理过后的拟南芥中,与独脚金内酯有关的生物合成基因的表达受到抑制。这些研究结果表明,通过向植物施加外源褪黑素处理,可以显著影响植物内源激素的产生和调节,从而导致一系列变化发生。

1.3.2 植物激素对褪黑素的作用

目前,虽然已经有很多研究报道了外源褪黑素处理对植物内部激素的影响效果,但与此相比,关于外源植物激素对植物内源褪黑素的影响的研究还相对较少。Chen 等^[32]研究了在山核桃中,外源脱落酸对内源性褪黑素的作用。他们发现,通过外源喷施脱落酸,山核桃中内源性褪黑素的水平得到显著提升。进一步组学分析以及验证实验结果表明,山核桃中对脱落酸应答因子(CcAZF2)和对乙烯应答因子(CcEIN3),可以通过直接结合启动子来激活褪黑素的生物合成。在Zhou 等^[33]的研究中,探究了吲哚乙酸(IAA)处理对桃果实的冷害及内源激素的影响。研究结果显示,经过吲哚乙酸处理后,桃果实中的内源褪黑素和 γ -氨基丁酸(GABA)含量均有所增加,并且这一变化与它们的生物合成基因的上调相关。这些发现揭示了吲哚乙酸处理可通过调节内源激素水平来减轻桃果实的冷害,并提供了吲哚乙酸对褪黑素和 GABA 合成相关的基因调控机制的线索。在水稻中,Hwang^[34]的研究表明,通过外源赤霉素的处理,水稻中内源性的褪黑素得到显著的提升。进一步体内验证实验表明,赤霉素可以作为水稻体内褪黑素合成的内源性启动子来提高其体内褪黑素的水平。Yin^[35]研究了外源茉莉酸甲酯对芥菜幼苗中内源性褪黑素的生物合成的影响。他们发现,茉莉酸甲酯能够显著诱导芥菜中褪黑素的表达,较对照处理提高 10 倍左右。而这是茉莉酸甲酯通过促进褪黑素合成酶的表达以及增加与色氨酸(褪黑素前体物质)的丰度来实现的。

以上研究结果都表明,无论是传统经典的植物激素(生长素、细胞分裂素、赤霉素以及脱落酸)还是近十几年来新发现的植物激素(茉莉酸、水杨酸、油菜素内酯以及独脚金内酯),它们在植物当中都与褪黑素的表达存在一定的联系,或影响其表达,或受其表达的影响。但是不同的文献报道了植物激素与褪黑素之间不同的影响情况,有的会促进褪黑素的表达,有的则会抑制褪黑素的表达;有的表达会受到褪黑素的促进,而有的表达又会受到褪黑素的抑制。因此关于植物

激素与褪黑素之间的相关性仍有待进一步的研究。然而，未来对于褪黑激素和植物内部激素的研究无疑将揭示细胞和组织层面上的相互作用程度，并探讨在调节反应中可能存在的协同作用或拮抗作用。

1.4 油菜素内酯的研究现状

1.4.1 油菜素内酯简介

油菜素内酯是一种胆甾烷羟基化后的衍生物，其结构包括了 A 环、B 环以 C-17 侧链上的烷基取代基（图一），是一种具有 5α -胆甾烷骨架并且包含多羟基的甾体激素^[36]。目前，研究人员已经成功从自然界各类不同种属的植物当中分离出了 70 多种油菜素内酯，以 2,4-表油菜素内酯（24-epibrassinolide, EBR）、2,8-高油菜素内酯（24-epibrassinolide, HBL）以及芸苔素内酯（brassinolide, BL）三种类型最为常见且应用最广^[37]。

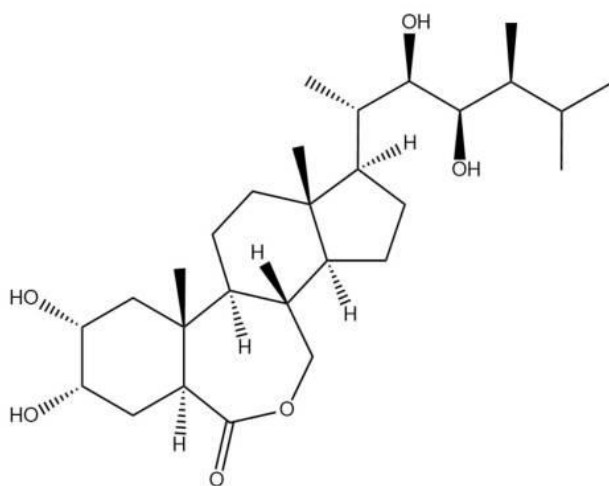


图 1-2 油菜素内酯的分子结构式

Fig.1-2 Molecular formula of brassinolide

1.4.1 油菜素内酯的生理功能

大量研究资料明确指出，油菜素内酯（brassinosteroid, BRs）在植物发育调控中扮演着重要的角色。作为一种重要的植物生长调节物质，它参与了植物的多个发育过程，包括细胞分裂、生长、维管分化、生殖发育以及基因表达等关键过程^[38]。此外，油菜素内酯还影响着种子从萌发到生根、开花、再到成熟，最后到衰老、脱落等一系列发育过程当中^[39]。作为植物生存与繁衍过程中重要的一环，萌发对于植物来说至关重要。然而这却受到多种因素的调控及影响，而油菜素内

酯就是其中的一个因素^[40]。Small 等^[41]发现, 0.1 mg/L 处理油菜素内酯溶液浸种处理牧草种子 24 小时之后, 其发芽率较对照提高了 42%以上。同样的发现在其他研究当中也能找到。Jesus^[42]等人研究了对油菜素内酯在绿大豆种子萌发过程中的作用。他们发现, 0.4、0.6 和 0.8 mM 的油菜素内酯处理的绿大豆种子的光合速率、PSII 光化学能转换有效量子产率和电子传递率均有提高, 大豆幼苗的品质以及生理发育得到了显著的提升。在拟南芥中, 油菜素内酯(BRs)能够通过拮抗脱落酸(ABA)对其造成抑制作用从而来促进种子的萌发。这里面涉及到的分子机制是拟南芥中 BRs 生成有关的转录因子 BES1, 其能够精确与 ABI5(一种脱落酸信号通路的转录因子)发生相互作用从而导致 ABA 的合成受阻, 进而实现对拟南芥种子萌发的调控^[43]。除此之外, 有关油菜素内酯促进植物其他生长发育过程在其他学者的研究中也找到证据, 如促进番茄果实的成熟^[44], 调控牡丹花的花期^[45], 调控马铃薯的衰老与成熟^[46]等等。以上研究都说明了油菜素内酯对植物的生理代谢具有着重要的作用。

此外, 近年来的研究表明, 油菜素内酯不仅能够协调植物的生长与发育, 而且还在植物面对各种环境胁迫, 例如干旱、重金属、极端温度等非生物胁迫与生物胁迫当中扮演着重要的角色^[47]。Kaya 等^[48]通过研究表明通过外源油菜素内酯(brassinosteroid, BRs)处理, 可以提高 ABA 水平, 从而减轻干旱对植株的不良影响。在逆境条件下, 添加油菜素内酯(brassinosteroid, BRs)到番茄中可以增强其光合器官、叶片的水分状态, 并改善抗氧化防御能力, 进而提高番茄植株的抗旱性能, 他们猜测是由于干旱调控的编码结构蛋白和调节蛋白的基因转录物被 BRs 处理改变。这在 Li 等^[49]人的研究中得到了验证, 油菜素内酯的诱导导致油菜植株的抗旱性增强, 而这种增强部分归因于油菜素内酯诱导的 BnCBF5 和 BnDREB(两种与干旱敏感性相关的基因)转录物水平的上调。此外, 油菜素内酯在植物抵御盐胁迫方面的作用也得到了证实。经外源油菜素内酯处理后, 研究显示, 叶片中钠离子(Na⁺)水平得到降低, 同时细胞膜透性得到改善。这些效应导致在盐胁迫的环境下, 光系统 II(PSII)的净光合速率、气孔调节、蒸散发、净光合以及最大量子产率显著提高^[50]。Chi 等^[51]人的研究发现, 泛素偶联酶(ubc32)在 BRs 引发的盐胁迫抗性中扮演了一定的角色。作为内质网相关蛋白降解(ERAD)途径的一员, UBC32 对于拟南芥细胞中 BRs 受体 BRI1 的积累起

着影响，并且指导 ERAD 途径在增强渗透调节的过程中发挥作用。这项研究揭示了 UBC32 在 BRs 信号传递和应对盐胁迫过程中的重要性，为进一步理解 BR 调控植物抗盐性响应提供了新的见解。油菜素内酯（BRs）的应用不仅可以增强植物的耐寒性，还对收获后的植物产品，如水果，产生积极影响。通过 BRs 的处理，水果在面对低温胁迫时能够延长其货架期，维持品质并提高保鲜度^[52]。

1.4.2 油菜素内酯与褪黑素的相互作用

当前，有关褪黑素与油菜素内酯之间相互作用关系的研究报道还较少，但是从现有的研究当中，我们还是能够发现它们之间存在着一定的串扰关系。Hwang 等^[53]人研究了外源性的褪黑素对油菜素内酯的诱导作用，他们发现通过外源添加褪黑素，水稻中有关几个油菜素内酯的生物合成基因包括 DWARF4、D11 和 RAVL1 的表达显著提高，褪黑素通过调节植物中油菜素内酯的生物合成，对在暗处无光照生长的植物起到了积极的调节作用。Fu 等^[54]研究了在褪黑素介导的多年生黑麦种子的耐寒以及耐旱性中，褪黑素与油菜素内酯之间串扰调节机制，他们发现当黑麦在发芽生长过程中受到胁迫并施加外源褪黑素处理时，油菜素内酯信号传导有关的基因转录水平得到了显著的增加。Li^[55]的研究也表明，在褪黑素处理下，苜蓿中有关油菜素内酯信号传导的相关基因的转录水平明显上升，苜蓿中油菜素内酯的含量也显著提高。

1.5 转录组学

1.5.1 转录组学概述

自上世纪九十年代后基因组学的时代的到来，转录组学的技术得到了广泛的应用于发展。转录组学是整体水平上研究细胞中基因转录情况及转录调控规律的学科。它涉及到细胞中所有信使 RNA 的总和，而这些 RNA 是参与到蛋白质翻译过程的关键。转录组学的研究方法能够让我们清楚的了解到细胞中基因的表达情况、转录水平变化以及转录调控的机制。转录组学的发展使得我们能够全面地洞察细胞内的基因表达网络，揭示基因调控的复杂性和多样性，为深入理解生物体的生理和疾病过程提供了重要的信息和理论基础。目前，转录组学技术主要有以下几种：基于杂交方法的微阵列技术(Microarray)、表达序列标签技术(expressed sequence tag, EST)、基因表达连续分析(serial analysis of gene expression, SAGE)、基因芯片(Gene chip)、差异显示技术(differential display reverse transcription,

DDRT)以及高通量测序 (High-throughput sequencing) 等^[56], 其中以 RNA-Seq 技术的应用最广。

1.5.2 转录组学在植物领域的应用

目前, 转录组学在植物学的应用范围越来越广, 从植物系统分类, 到植物物种的鉴定以及植物遗传多样性, 转录组学扮演着越来越重要的角色。借助转录组, 我们能够认识到植物转录因子在植物的胁迫应答中扮演的重要角色, 能够认识到这些转录因子在植物对各种胁迫条件做出响应的过程中起到了重要的调控作用^[57], 它们通过直接调控胁迫应答基因的转录, 并在多种信号通路之间进行调节, 发挥着关键的功能; 通过转录组学的手段, 我们可以清晰地揭示在植物体面临极端环境变化时, 不同基因在表达水平上发生的变化。如根据 Kahlau 和 Bock^[58]的研究结果, 番茄果实中质体基因的转录组学分析显示, 在与叶片相比较时, 大部分质体基因在果实中表达水平下调。这种变化在光合作用相关基因中比其他代谢途径相关基因更为显著。此外, 转录组分析揭示了染色体上的基因表达活性受质体编码的脂肪酸生物合成基因 *accD* 的调控。在茄科植物中, 转录组学研究表明了环糖合成的不同机制, 以及存在的几种导致重要防御化合物合成/生产的趋同和发散机制^[59]。除了用于研究盐胁迫耐受机制外, 转录组学还可广泛应用于研究冷胁迫反应, 这在马铃薯等植物中已有相关报道。Evers^[60]的研究报道了在低温和盐度胁迫条件下, 大多数光合作用基因表达水平下调, 而细胞拯救和转录因子基因表达水平上调。盐暴露还会导致与初级代谢、信号转导和解毒相关的基因表达水平下调。因此, 通过转录组来解释植物中的一些生理代谢机制, 具有深远的实际意义。

1.5.3 转录组学在植物褪黑素中的应用

基于高通量 RNA 测序 (RNA sequencing, RNA-seq), 转录组学能够从整体水平上研究并分析出植物在发育、遗传过程中以及代谢调控过程中基因的表达变化^[61]。RNA-seq 具有高通量、高灵敏度以及应用范围广等优点。而近年来, 随着基因测序技术的不断发展与更新, 与测序的成本越来越低, 转录组技术也被越来越广泛应用到植物的研究当中。目前, 很多研究通过转录组学的技术手段, 揭示了植物体内褪黑素生物合成及代谢机制。如通过转录组学的方法, Shi 等^[62]人揭示了褪黑素在提高百慕大草的抗盐、干旱以及冷胁迫抗性方面的机理。而这种机

理与褪黑素提高参与氮代谢、主要碳水化合物代谢、三羧酸(TCA)/org 转化、运输、激素代谢、金属处理、氧化还原和次生代谢的基因的表达水平有关。在对褪黑素处理芥蓝的研究中进行转录组分析时, Di 等^[63]人发现一些与苯丙素生物合成、类黄酮生物合成以及 α -亚麻酸生物合成相关基因出现过量表达, 这为褪黑素缓解芥蓝抗衰老的机制提供了新的简介; 利用转录组学在对褪黑素介导的玉米幼苗昼夜代谢变化对盐胁迫响应机制的研究当中发现, 褪黑素能够通过激活包括 JAZ3-1、JAZ9、WRKY28、ERF020 等一系列应激和激素相关转录因子来提高玉米的耐盐性^[64]。Yang 等^[65]人利用转录组学研究了褪黑素在诱导菜豆耐盐性方面的作用, 并通过 GO 与 KEGG 分析鉴定出了褪黑素的关键下游转录因子以及这些因子在菜豆耐盐性方面发挥的作用。此外, 借助转录组学的方法, Pham 等^[66]人成功发现了 CsCOMT19 (参与 5-羟色胺代谢生成褪黑素的酶) 在调控茶树中褪黑素的合成中的作用, 为研究 CsCOMT 基因家族在茶树生长发育过程中响应非生物胁迫时的作用提供了有价值的信息。总得来看, 转录组在研究植物中褪黑素的生物合成以及调控作用方面的发挥了巨大的作用, 未来转录组学在此方面的研究仍然具有着很大的潜力。虽然目前转录组学的技术发展已经很成熟, 并且很多常见植物或水果有关褪黑素的转录组研究报道已经很多, 但是目前国内外有关青稞褪黑素生物合成以及富集机理的相关转录组的研究还很少, 通过转录组学的手段揭示青稞富集褪黑素的机理, 具有开创性的意义。

1.6 研究内容及目的意义

1.6.1 研究内容

(1) 研究了三种植物激素 (赤霉素、乙烯以及油菜素内酯) 处理对萌发青稞中褪黑素富集效果的影响, 以及油菜素内酯处理下对萌发青稞生理代谢情况包括功能成分的影响。

(2) 以转录组学为手段, 通过对不同浓度下油菜素内酯处理下的样品进行分析研究, 在基因的水平上找到外源油菜素内酯富集青稞籽粒中褪黑素的关键性基因, 初步揭示油菜素内酯诱导萌发青稞中褪黑素富集的分子机制。

1.6.2 研究目的及意义

褪黑素是一种普遍存在于人体内器官中的一种分子, 包括心脏、松果体以及骨髓等, 当人体缺乏时, 它可以通过非处方补充剂来获取。目前, 褪黑素在启动

睡眠、抗衰老、抗肿瘤以及抗炎等方面的生理功能已经得到了广泛的研究与证明。食用富含褪黑素的食物有助于提高人体中血清浓度以及抗氧化水平, 对人体的健康有益。而过去几年里, 人们对于保持对食物的需求, 对人体有益食物的追求, 导致了新食品产业的快速发展, 开发富含褪黑素的功能性食品也势在必行。

青稞作为我国青藏地区的主要粮食作物, 是我国唯一能够在超过海拔 4500 米以上的地区种植的农作物, 其营养成分全面且独特, 富含很多包括褪黑素在内的功能活性物质, 具有着显著的营养与医疗价值。然而目前, 有关青稞的研究还基本停留在一些营养成分的检测与提取等表层研究中, 有关利用转录组等组学手段来解释青稞籽粒中的生理代谢机制的研究仍然很少, 而关于植物激素诱导青稞籽粒中褪黑素的富集相关的研究更是几近于无。因而本实验以青稞品种藏青 2000 为实验材料, 重点研究了油菜素内酯对青稞籽粒中褪黑素富集作用的影响, 并透过转录组学的手段, 研究植物激素富集青稞籽粒当中褪黑素富集的分子机制, 以期开发高富含褪黑素的青稞品种以及功能性食品提供一定的理论依据与实际意义。

第2章 不同植物激素处理对萌发青稞褪黑素富集的影响

2.1 前言

植物种子蕴含着过去的遗传信息和未来的生命潜能。作为植物生命的起点，种子承担着保护胚胎和感知环境的重要任务，确保发芽与季节的协调，以促进植物完整的生命周期。在这个过程中，种子发挥着至关重要的作用。在种子的生命周期当中，包含了胚胎的发育、成熟以及萌发。当它接近成熟期的结束时刻，伴随着脱水效应的开始，种子由此获得了具备抵抗干燥条件的能力，并最终进入一种被称为初级休眠的潜伏状态^[67]。这是植物最为关键的适应机制之一，这保护了种子不会在不利的条件下过早发芽，避免了不适宜的条件给种子带来的危害。

植物种子的休眠与萌发涉及到多个因素的调控，是一个复杂的生物学过程，并且也是植物适应性的重要组成部分。种子的休眠水平过低会导致早期发芽，这可能给谷物作物造成经济损失。另一方面，休眠水平过高则会抑制种子的萌发，降低其生长活力和生命力，并对植物当中一些功能性成分造成一定的影响^[68]。因此，维持适度的种子休眠水平对于植物的生长和发育至关重要。适当的休眠水平可以确保种子在适宜的环境条件下萌发，使其具备良好的生长潜力。而在这个过程中，植物激素发挥着关键的调节作用。植物激素在种子休眠期间抑制发芽，并在合适的条件下促进种子的萌发。这些激素包括赤霉素、生长素、乙烯、脱落酸以及油菜素内酯的等等植物激素。目前，很多研究表明了它们能够通过彼此之间的相互作用和制衡来调节种子的休眠状态和萌发能力^[69]。如种子在经过吸胀作用后，种子中的活胚以及非休眠胚会释放赤霉素到胚乳中，进而激活各种酶的活性，包括淀粉酶、蛋白酶、葡聚糖酶以及核糖核酸酶，这些酶在糊粉层中发挥作用来使种子萌发^[70]；广泛的研究支持了种子发芽与产生乙烯是密切相关的这一观点。乙烯在种子发芽过程当中不仅参与了氧化酶活性的调控，还通过抑制脱落酸的作用来刺激植物种子的萌发^[71]；油菜素内酯参与调节种子萌发的机理与乙烯类似，其是通过拮抗脱落酸的作用与激活赤霉素生物合成通路中 GA 基因的表达来诱导种子的萌发^[72]。

近年来，内源性褪黑素与包括赤霉素、乙烯、油菜素内酯等在内的植物激素

的串扰网络关系在各种植物中得到了一定数量的探讨与研究。如前文绪论部分提到的,褪黑素与植物激素已经被证明在植物的生长发育过程当中存在一定的相互作用关系,这已被很多学者通过研究来证明^[73]。如赤霉素可作为内源性诱导子在诱导水稻幼苗和未成熟的种子合成内源性褪黑素的作用^[74];又比如乙烯通过启动山核桃中对乙烯应答基因 *CcEIN3*, 使后者通过结合其启动子来激活褪黑素生物合成途径的基因,从而来调控内源性褪黑素的生物合成^[32];最后以及油菜素内酯在诱导褪黑素合成中的作用。虽然关于植物激素诱导内源性褪黑素的合成已经有了少量的研究提供了理论支撑,然而,目前有关植物激素调节青稞中内源性褪黑素的研究还未见报道,所以关于植物激素与青稞中内源性褪黑素的相互作用关系仍有待研究。

因此,维持一个良好的平衡和高度调节的种子休眠水平是确保种子在适宜的时间和地点进行萌发的先决条件。及时发现并更新植物激素对青稞籽粒萌发过程中的生长情况,以及对褪黑素富集作用的影响的知识是必要的。这能为我们提供植物激素影响青稞萌发以及培育富含褪黑素的青稞种子进而开发高富含褪黑素的功能性食品提供理论依据。因而在本章,采用了赤霉素、乙烯以及油菜素内酯三种植物激素在不同浓度下对青稞籽粒进行萌发处理,研究在此条件下萌发青稞的生长情况以及褪黑素富集情况。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 实验材料

本实验以藏青 2000 (青稞品种名) 为实验材料, 由西藏农牧学院提供

2.2.2 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagents

试剂名称	规格	厂家
油菜素内酯	≥90.0 %	阿拉丁生化科技股份有限公司
脱落酸	≥90 % (HPLC)	阿拉丁生化科技股份有限公司
乙烯利	>90.0 % (HPLC)	阿拉丁生化科技股份有限公司
赤霉素	>90.0 % (HPLC)	阿拉丁生化科技股份有限公司
甲醇	AR	国药集团化学试剂有限公司

试剂名称	规格	厂家
Plant MT ELISA	/	上海桥杜生物科技有限公司

2.2.3 实验设备

表 2-2 实验设备

Table 2-2 Experimental equipment

设备名称	型号	厂家
电子天平	JY1002	上海精密科学仪器有限公司
种子发芽箱	YRG-150	上海合恒仪器设备有限公司
真空冷冻干燥机	LGJ-12	北京松源华兴科技有限公司
高速粉碎机	FW100	天津市斯泰特仪器有限公司
超声波清洗仪	030S	深圳市超洁科技实业有限公司
台式高速冷冻型微量离心机	D3024R	北京大龙兴创实验仪器有限公司
酶标仪	1510	上海赛默飞世尔仪器有限公司

2.2.4 实验方法

2.2.4.1 油菜素内酯处理

挑选饱满无损伤的藏青 2000 青稞籽粒，用无菌水冲洗掉杂质后在滤纸上滤干，然后用 1 % 的次氯酸钠溶液消毒 15 min。然后用无菌水冲洗 3-5 遍后放置于不同浓度的预先配置好的油菜素内酯溶液中浸泡 10h 让种子水合，油菜素内酯溶液的浓度为 0 μmol 、50 μmol 、100 μmol 、200 μmol 。水合处理完成后将青稞籽粒置于智能种子培养箱中进行发芽，同时记录青稞籽粒的生长情况。每隔 24 h 收取长势一致的芽苗，在经真空冷冻干燥后研磨成粉末，过 80 目筛后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2.4.2 赤霉素处理

种子的前处理同 2.2.4.1，将用无菌水消毒灭菌后的青稞种子放置于不同浓度的预先配置好的赤霉素溶液中浸泡 10 h 让种子水合，赤霉素溶液的浓度分别为 0 μmol 、50 μmol 、100 μmol 、200 μmol 。水合处理完成后将青稞籽粒置于智能种子培养箱中进行发芽，同时记录青稞籽粒的生长情况。每隔 24 h 收取长势一致的芽苗，在经真空冷冻干燥后研磨成粉末，过筛后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2.4.3 乙烯处理

种子的前处理同 2.2.4.1, 将用无菌水消毒灭菌后的青稞种子放置于不同浓度的预先配置好的乙烯溶液中浸泡 10 h 让种子水合, 乙烯溶液的浓度分别为 0 μmol 、50 μmol 、100 μmol 、200 μmol 。水合处理完成后将青稞籽粒置于智能种子培养箱中进行发芽, 同时记录青稞籽粒的生长情况。每隔 24 h 收取长势一致的芽苗, 在经真空冷冻干燥后研磨成粉末, 过筛后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2.4.5 青稞籽粒萌发生理指标的测定

直尺手动测量青稞幼苗的胚根、胚芽长, 并观察纪录青稞籽粒幼苗的生长。

2.2.4.6 青稞种子褪黑素含量的测定

褪黑素样品液的提取参考孟想^[75]的方法: 取 0.1 g 事先制备好的青稞粉末于离心管中, 加入 2 mL 50% 甲醇溶液充分摇匀震荡, 并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内过夜。然后将样品液置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 超声清洗仪中超声 30 min, 8000 r/min 的高速冷冻型微量离心机中离心 30 min, 收集上清液置于棕色离心管中保存。重复上述操作, 合并上清液并用 50 % 甲醇溶液调整至 2 mL, 所制得提取液用于测定褪黑素。

褪黑素含量的测定完全按照 Plant MT ELISA 试剂盒的说明书所述进行。首先取出试剂盒中板孔在常温中静置 20 min, 并设置标准品孔和待测样本孔。向标准品孔中加入 50 μL 不同浓度的标准品。向样本孔中加入 10 μL 待测样本, 然后加入 40 μL 样本稀释液。然后向标准品孔与待测样本孔中加入 100 μL 辣根过氧化物酶 (HRP), 封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中避光孵育 1 h。取出样板, 弃去反应样液, 在吸水纸上拍干, 用洗涤液重复洗板 5 次。然后向反应孔中一次加入 50 μL A 液与 B 液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中避光孵育 15 min。向反应孔中加入 50 μL 终止液, 放置于酶标仪中测定标准品孔与样孔的 OD 值, 以标准品浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线并计算褪黑素的含量。

2.2.5 数据统计及分析

所有样本均设置 3 组重复, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 SPSS22.0 软件进行数据分析处理; 并用 Origin2018 软件进行绘制图表。

2.3 结果及分析

2.3.1 油菜素内酯对萌发青稞中褪黑素含量的影响

如图 2-1 所示, 不同浓度的油菜素内酯溶液处理下的青稞幼苗在生长上有着一定的差异性, 50 μmol 及 100 μmol 在前三天能够促进青稞籽粒胚芽的生长。而

浓度超过 $100\ \mu\text{mol}$ 来到 $200\ \mu\text{mol}$ 时,油菜素内酯溶液则会表现出对青稞幼苗生长的抑制.油菜素内酯是一类主要的植物生长激素,被广泛认为是促进植物生长和发育的关键调节因子,同时也参与着种子萌发的调控过程。它在后续植物胚胎的发育及后续的细胞分裂当中仍扮演着一个重要的角色,它通过信号转导以及与其他植物类激素相互作用来调控植物的生长^[76]。在一定的阈值范围内,油菜素内酯被认为是对植物有着良好的促进生长的作用。然而,过度的包括油菜素内酯的植物激素的使用会抑制甚至损害植物的生长。显然, $200\ \mu\text{mol}$ 的油菜素内酯溶液的处理对青稞籽粒的生长发育造成了一定的抑制效果。图 2-2 也说明了这一表象。不同浓度的油菜素内酯浓度影响了青稞幼苗的胚芽及胚根的发育程度,随着油菜素内酯的浓度逐渐增加,青稞籽粒幼苗的发育受到一定的促进作用,而当浓度增加到 $200\ \mu\text{mol}$ 时,青稞籽粒胚芽的发育则受到抑制,长度明显减少。

如下图 2-3 所示,研究结果表明,随着萌发天数的推进,青稞籽粒当中的褪黑素都呈现先上升然后再下降的趋势。而与其它组不同的是, $100\ \mu\text{mol}$ 浓度的油菜素内酯溶液浸种后的青稞籽粒中,褪黑素在第三天时的含量来到最大为 $19.42\pm 0.33\ \text{ng/g}$, 是对照组 (CK, $14.42\pm 0.18\ \text{ng/g}$) 的 1.34 倍、是种子 ($11.46\pm 0.15\ \text{ng/g}$) 的 1.69 倍。目前,发芽已广泛应用于提高食用谷物种子的营养价值,并且许多研究已经显示发芽对于改变谷物种子的理化性质具有显著影响^[77]。以上研究结果表明,油菜素内酯对青稞中褪黑素含量的变化也能产生一定的影响效果。而这与 Hwang 等^[78]人的研究结果相似。他们发现,过外源油菜素内酯处理后,水稻中有关几个褪黑素的生物合成基因包括 DWARF4、D11 和 RAVL1 的表达显著提高,水稻当中内源性褪黑素的含量得到了明显的提升。

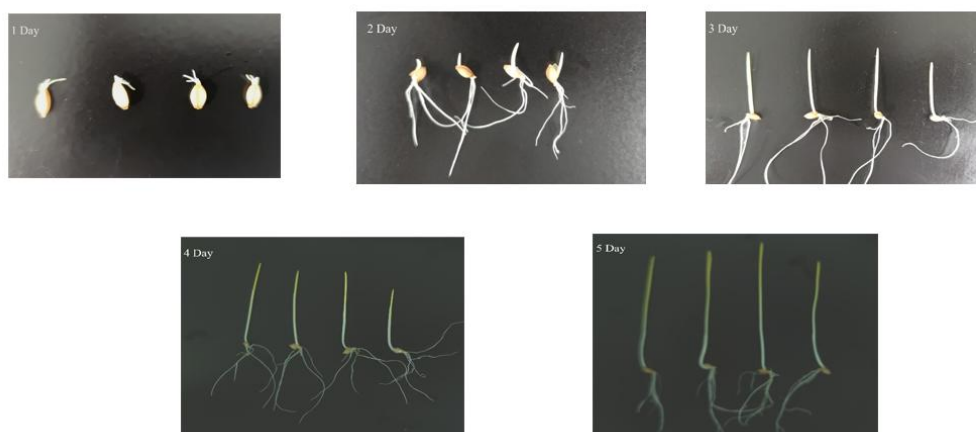


图 2-1 油菜素内酯处理下青稞籽粒生长情况

Figure 2-1 Growth of hulless barley kernels under epibrassinolide treatment

注：每张图片从做到右油菜素内酯处理浓度分别为 0、50 μmol 、100 μmol 以及 200 μmol 。

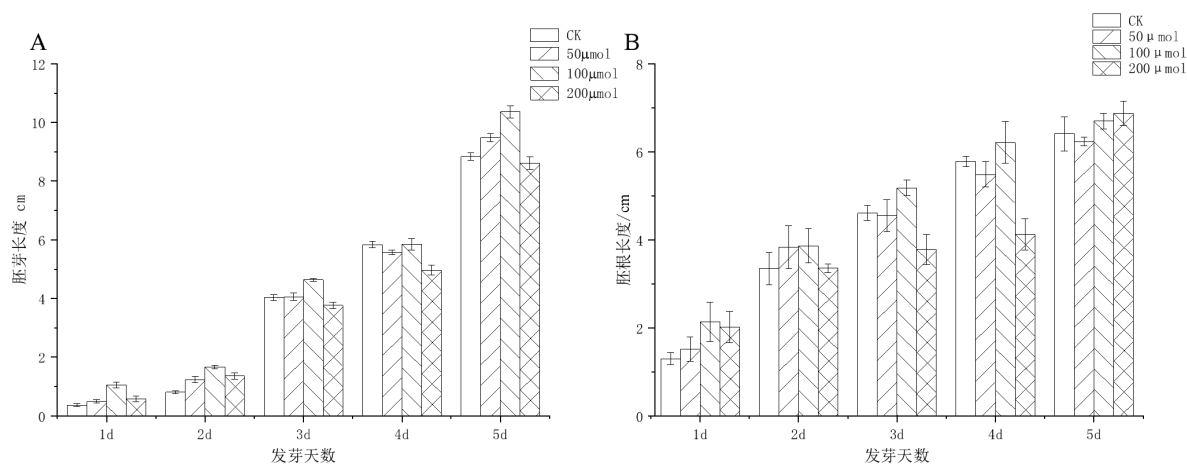


图 2-2 不同油菜素内酯处理对萌发青稞胚根及胚芽长度的影响

Fig.2-2 Effect of different epibrassinolide treatments on the length of sprouted barley radicle and germination

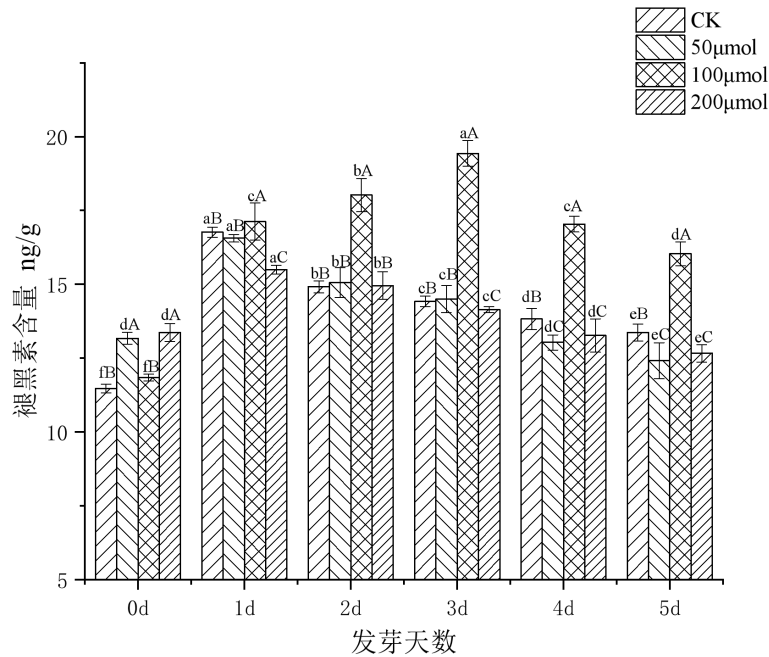


图 2-3 油菜素内酯处理对青稞籽粒褪黑素含量的影响

Fig. 2-3 Effect of epibrassinolide treatment on melatonin content in hulless barley

注：图中含有不同小写字母表示在同一油菜素内酯的浓度下不同发芽天数中青稞幼苗中褪黑素含量之间的差异显著 ($p < 0.05$)；图中含有的大写字母表示青稞幼苗在相同发芽天数下不同油菜素内酯浓度处理中褪黑素含量差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3.2 乙烯对萌发青稞中褪黑素含量影响

如图 2-4，不同浓度的乙烯处理后的萌发青稞的生长情况跟油菜素内酯处理后的结果相似，但有些许的不同。相同点都表现为在 $50 \mu\text{mol}$ 以及 $100 \mu\text{mol}$ 浓度下，乙烯对于青稞幼苗胚根及胚芽的促增长效果较为明显，而当浓度继续增加到 $200 \mu\text{mol}$ 时，相较对照，乙烯处理仍能表现为对青稞幼苗的促进作用，但结果相较于前两组来看，这种促进作用不太明显。可能是因为 $200 \mu\text{mol}$ 浓度下的乙烯处理还没有超过青稞幼苗所能承受的最大临界值，所以在这样浓度的处理下仍表现为对胚芽胚根的促增长作用。作为一种植物当中少有的以气态形式存在的植物激素，乙烯是调控种子休眠与萌发的重要因素。它可以通过调节植物中其它两种植物激素（赤霉素、脱落酸）之间的相互平衡来实现对休眠种子的调节^[79]。而已有学者通过研究表明，这种作用是乙烯通过调节脱落素以及赤霉素的代谢以及信号通路来实现的^[80]。我们的研究结果观察到了乙烯处理能够刺激增长青稞幼

苗的萌发,但具体涉及到的分子机制如是否通过调节赤霉素或者脱落酸的水平来实现的,这需要以后进一步的实验。

目前,已有充分的研究表明褪黑素通过调节通路相关酶、受体以及转录因子的表达,能够实现对生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸(ABA)、乙烯、茉莉酸、水杨酸和油菜素内酯等植物激素的生物合成和分解代谢造成影响^[81]。然而,目前有关乙烯对植物的褪黑激素水平产生影响的研究还鲜有报道。在乙烯处理后的青稞幼苗中褪黑素的影响实验我们可以看出,青稞籽粒中褪黑素的水平在不同浓度的乙烯处理下都表现为先增加后减少的趋势。各组中褪黑素的含量都在处理后第一天萌发时表现为最高,然后随着萌发时间的延长,褪黑素含量开始下降。与对照组相比,50 μmol 浓度乙烯处理下的发芽第一天青稞籽粒中褪黑素在各组中表现最大,为 $16.09 \pm 0.25 \text{ ng/g}$,是同期对照组 ($15.27 \pm 0.22 \text{ ng/g}$) 的 1.05 倍。而当青稞芽苗生长到第 4、5 天时,乙烯处理组 (50 μmol 、100 μmol 与 200 μmol) 中褪黑素的水平甚至低于对照组中。这表明了乙烯处理对青稞中褪黑素的诱导效果不明显,甚至会对褪黑素的富集造成抑制效果。而这可能是由于植物个体的差异性所导致的结果。与 Hu 等^[82]人的研究结果相类似的是,他们发现在香蕉的采后阶段,香蕉中内源性褪黑素表现出与乙烯相似的行为,并且外源褪黑素的处理会直接导致香蕉中内源性乙烯的含量降低,褪黑素表现出对乙烯的抑制作用。而这在另一篇报道当中也能得到相似的研究结果。内源性褪黑素通过降低乙烯的生物合成来平衡自身的稳态,进而延缓西蓝花的衰老,延长西蓝花的贮藏寿命^[83]。这与 Chen 等^[32]人的研究结果相反,他们报道了乙烯能够调控山核桃中褪黑素的生物合成。由此看来,不同种类的植物中,乙烯对植物个体中褪黑素的调控效果是不同的,而导致这一结果不同的原因,则需要未来进一步的研究来揭示。



图 2-4 乙烯处理下青裸籽粒生长情况

Fig. 2-4 Growth of hulless barley kernels under ethephon treatment

注：每张图片从做到右油菜素内酯处理浓度分别为 0、50 μmol 、100 μmol 以及 200 μmol 。

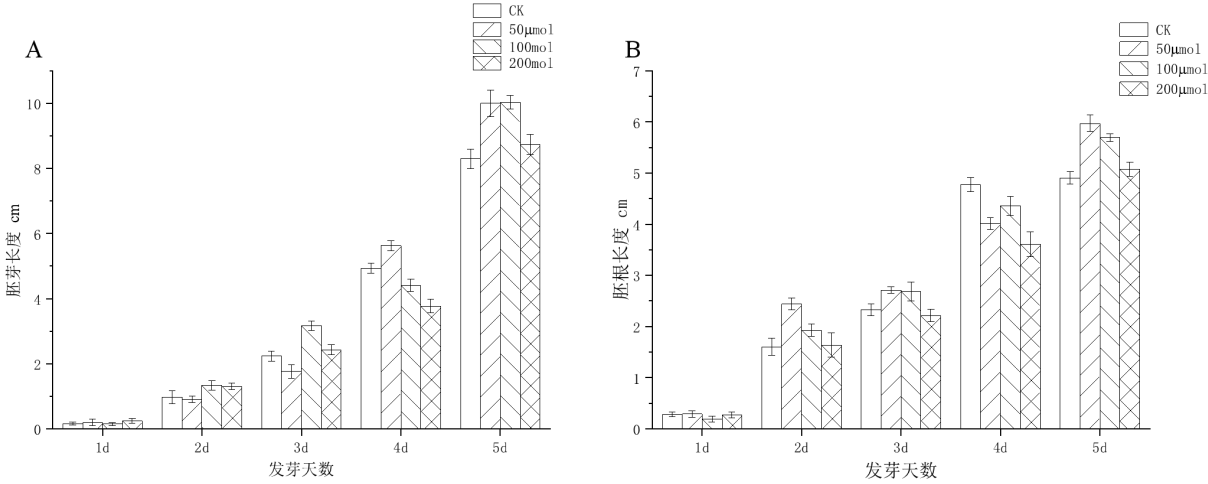


图 2-5 不同浓度乙烯处理对萌发青裸胚根及胚芽长度的影响

Fig. 2-5 Effect of different concentrations of ethylene treatment on the length of sprouted barley radicle and germ

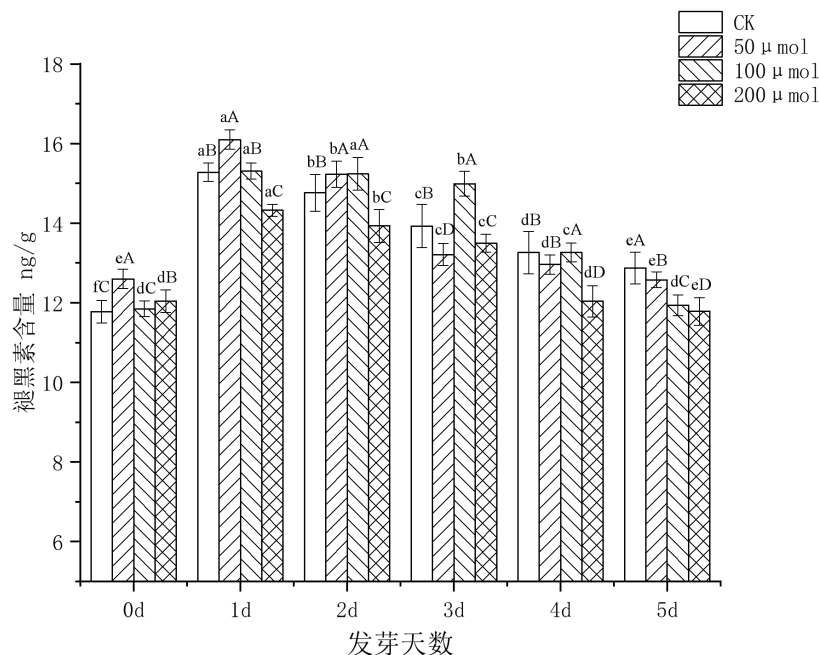


图 2-6 不同浓度乙烯处理对萌发青稞中褪黑素含量的影响

Fig. 2-6 Effect of different concentrations of ethylene treatment on melatonin content in germinating barley

注：图中含有不同小写字母表示在同一乙烯的浓度下不同发芽天数中青稞幼苗中褪黑素含量之间的差异显著 ($p < 0.05$)；图中含有的大写字母表示青稞幼苗在相同发芽天数下不同浓度乙烯处理中褪黑素含量差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3.2 赤霉素对萌发青稞中褪黑素含量影响

在种子发生吸胀作用后，赤霉素在种子的萌发过程当中扮演了重要的角色。这一点，在我们的实验当中也能得到验证。如图 2-7，下图展示了在不同浓度（0、50 μmol 、100 μmol 以及 200 μmol ）的赤霉素处理下，青稞种子从第 1 天开始一直萌发到第 5 天的生长情况。胚根在第一天开始从青稞种子中长出，而胚芽则从第二天开始萌出。而相较对照组，不同浓度的赤霉素处理显然对青稞种子的生长产生了影响。在 50 μmol 的赤霉素处理下，青稞幼苗的胚根及胚芽的发育成都明显由于处理组。然而当赤霉素处理浓度增加至 100 μmol 甚至 200 μmol 时，青稞萌发效果较对照组而言不太明显，赤霉素处理的条件下胚根及胚芽长度相较对照度没有明显的变化（图 2-8）。种子作为一个复杂的实体，包含了产生新组织所需的所有遗传信息，而它的萌发，也是一个涉及到多种生理反应的复杂过程^[84]。

赤霉素对种子的萌发作用是通过克服部分与脱落酸（ABA）诱导的休眠有关的限制以及克服胚胎周围组织的抗性，包括被和胚乳所赋予的抗性^[85]。在本次研究中，这种克服抗性的效果的确能够通过胚根胚芽的伸长来体现，而这是否与抵抗 ABA 的作用来实现这一效果的，我们的研究暂时还不得而知。

在本次研究中，我们调查了在外源赤霉素的处理下，青稞籽粒当中内源性褪黑素含量的变化情况，结果如图 2-9。总体上来看，赤霉素对于萌发青稞中褪黑素的诱导效果并不明显，仅在 50 μmol 处理（ 13.26 ± 0.25 ）下第 0 天时相较于对照组（ 11.70 ± 0.28 ）有着明显的诱导作用，是对照组的 1.15 倍左右。通常情况下，植物正常生长过程中，内源性褪黑素的水平处于较低的状态，这提供了植物激素作为植物褪黑激素受体功能的必要信号分子的支持^[86]。第一章绪论部分已经提高过，如今在植物当中，褪黑素能够对各类植物激素都具备一定的调控作用，而相反，植物激素在诱导植物当中内源性褪黑素的作用也开始慢慢被发现并研究证实。赤霉素对内源性褪黑素的调控作用在 Hwang 等^[34]人的研究中得到了证实，他们首次报道了赤霉素能够积极参与水稻当中褪黑素的生物合成，而这一效果与褪黑素生物合成基因如 TDC3、T5H 和 ASMT1 的表达水平升高是密切相关的。在我们的研究当中，我们观察到了在外源赤霉素的影响下，青稞籽粒中褪黑素仅在第 0 天时有较低的增加，而随着发芽时间的增加，这一现象并没有更进一步的变化，这可能是由于不同物种之间的差异性所导致的。

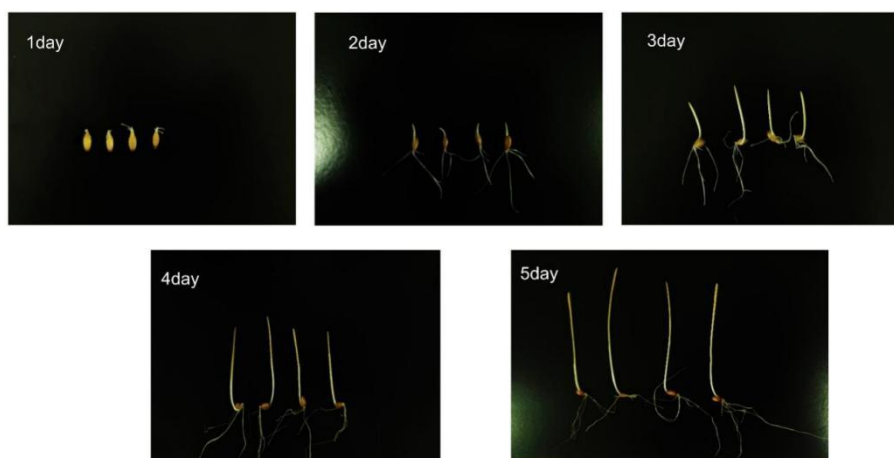


图 2-7 赤霉素处理下青稞籽粒生长情况

Fig. 2-7 Growth of barley kernels under gibberellin treatment

注：每张图片从做到右油菜素内酯处理浓度分别为 0、50 μmol 、100 μmol 以及 200 μmol 。

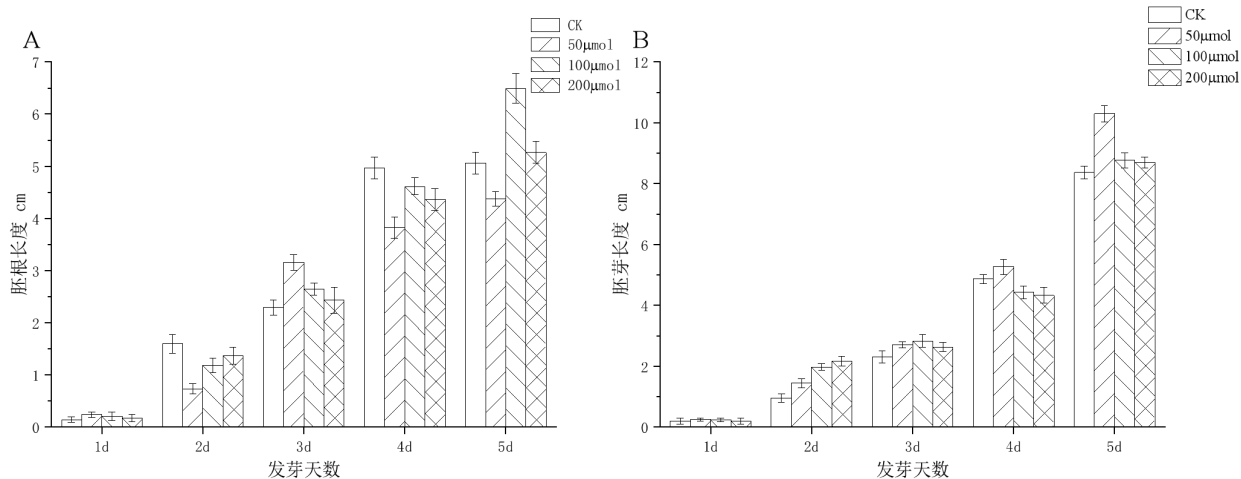


图 2-8 不同浓度赤霉素处理对萌发青稞胚根及胚芽长度的影响

Fig. 2-8 Effect of different concentrations of gibberellin treatments on the length of sprouted barley radicle and germination

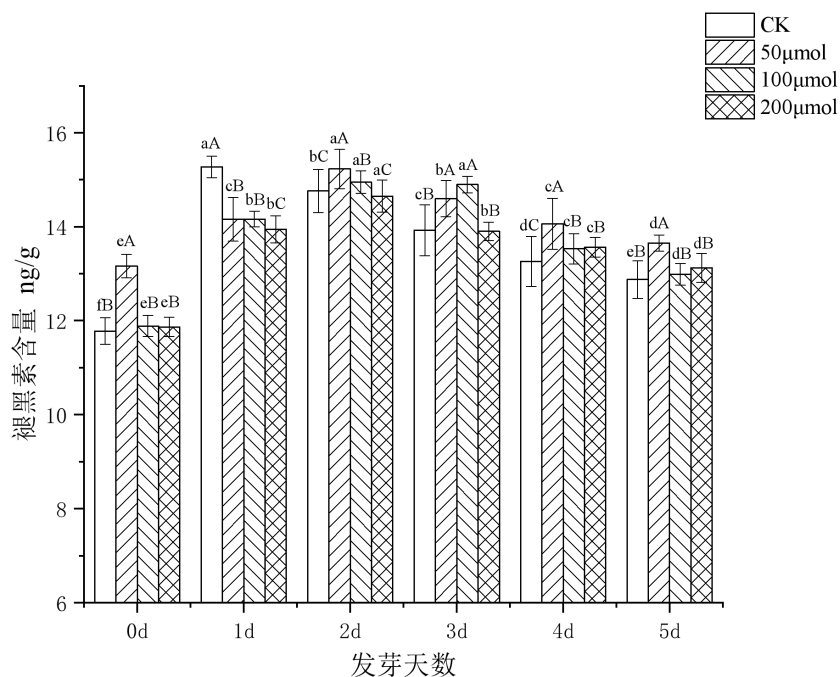


图 2-9 不同浓度赤霉素处理对萌发青稞中褪黑素含量的影响

Fig. 2-9 Effect of different concentrations of gibberellin treatments on melatonin content in sprouted barley

注：图中含有不同小写字母表示在同一赤霉素的浓度下不同发芽天数中青稞幼苗中褪黑素含量之间的差异显著 ($p < 0.05$)；图中含有的大写字母表示青稞幼苗在相同发芽天数下不同浓度赤霉素处理中褪黑素含量差异显著 ($p < 0.05$)。

2.4 本章小结

本章探究了三种不同植物激素油菜素内酯、赤霉素以及乙烯的外源处理下，萌发青稞的生长情况以及褪黑素富集情况。结果表明：

1. 油菜素内酯、赤霉素以及乙烯在不同的浓度下对青稞幼苗的生长情况的影响是不同的 50 μmol 以及 100 μmol 的浓度下能够明显促进青稞幼苗胚根以及胚芽的生长，而在 200 μmol 浓度下则会表现出对青稞幼苗生长的抑制作用；乙烯表现出的作用与油菜素内酯相似，都表现为低浓度下（50 μmol 与 100 μmol ）下外源处理能够促进青稞幼苗的生长，促进胚根及胚芽的发育；而赤霉素不同于油菜素内酯与褪黑素，只在 50 μmol 的浓度下表现出对青稞幼苗生长的促进作用，100 μmol 及 200 μmol 下则会表现出抑制作用。

2. 三种植物激素的处理下，油菜素内酯对于青稞幼苗中褪黑素富集效果最好，在第三天时达到最大，为 $19.42 \pm 0.33 \text{ ng/g}$ ，是对照组（CK， $14.42 \pm 0.18 \text{ ng/g}$ ）的 1.34 倍、是种子（ $11.46 \pm 0.15 \text{ ng/g}$ ）的 1.69 倍。在 50 μmol 浓度的乙烯处理下的发芽第一天青稞幼苗中褪黑素在各组中表现最大，为 $16.09 \pm 0.25 \text{ ng/g}$ ，是同期对照组（ $15.27 \pm 0.22 \text{ ng/g}$ ）的 1.05 倍；在 50 μmol 赤霉素处理（ 13.26 ± 0.25 ）下第 0 天时相较对照组（ 11.70 ± 0.28 ）对青稞幼苗中褪黑素有着明显的诱导作用，是对照组的 1.15 倍左右。通过比较的结果来看，乙烯与赤霉素对诱导青稞幼苗中褪黑素富集的效果远不如油菜素内酯。

第3章 外源油菜素内酯对萌发青稞生理代谢的影响

3.1 前言

近几年来,发芽因其能够增加谷物中的营养而受到人们极大的关注。谷物萌发是一个涉及到多种因素的复杂过程,并且其会对谷物的营养特性以及消化特性^[87]。青稞作为一种富含优越的营养价值与健康益处的谷物,它的发芽能够对青稞种子中的淀粉、蛋白质、多糖以及包括褪黑素在内的功能活性物质产生显著的影响。

目前,油菜素内酯(BRs)被广泛报道在植物抗逆性过程发挥的作用,如BRs在提高菊花抗旱性方面的作用^[88];对干旱胁迫下玉米幼苗生理生化和抗旱机制的保护作用^[89];在提高茶树抗寒性方面的保护作用^[90];在提升豇豆耐盐性方面的作用^[91]以及保护竹笋避免冷害提升低温抗性方面的作用等等。此外BRs对于植物生长发育的促进作用也已得到了很多研究的证明。而BRs对于调控植物中功能活性物质的相关研究却鲜有报道。研究表明BRs在植物营养部位分布的程度显著高于植物的生殖组织,这表明BRs或许对植物中的营养成分具有着重要的作用。而近年来,很多学者报道了BRs对于植物的次生代谢有着显著的影响,周伟江^[92]在他的研究中发现油菜素内酯能够调节水稻幼苗中的一些功能物质如可溶性糖、可溶性蛋白以及部分游离的氨基酸,和一些酶的活性(过氧化氢酶、过氧化物酶以及超氧化物歧化酶)来增强其抵抗低温的能力;Qian等^[93]油菜素内酯在植物响应碱胁迫下的作用,发现外施油菜素内酯能够减弱MDA对高粱造成的负面影响。虽然如今已有很多研究报道了油菜素内酯在植物生长以及抗逆过程中发挥的作用,但是关于油菜素内酯如何影响萌发青稞中的生理代谢却鲜有报道。

因此本章研究外源油菜素内酯处理对萌发青稞中一些功能活性成分的影响,探明在不同油菜素内酯溶液处理下,萌发青稞中 β -葡聚糖、 γ -氨基丁酸、总酚、总黄酮、总淀粉以及丙二醛的影响的变化规律。

3.2 实验材料与方法

同2.2.1。

3.2.1 实验试剂

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagents

试剂名称	规格	厂家
油菜素内酯	≥90.0 %	阿拉丁生化科技股份有限公司
支链淀粉	来自玉米	阿拉丁生化科技股份有限公司
直链淀粉	玉米来源	阿拉丁生化科技股份有限公司
福林酚试剂	BR	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
碳酸钠, 无水	AR	国药集团化学试剂有限公司
亚硝酸钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
硝酸铝, 九水	AR	国药集团化学试剂有限公司
盐酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
碘化钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
碘	AR	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
三氯乙酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
乙二醇四乙酸二钠盐, 二水	AR	国药集团化学试剂有限公司
2-硫代巴比妥酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
PLANT β -GLUCANS ELISA KIT	/	上海桥杜生物科技有限公司
PLANT GABA ELISA KIT	/	上海桥杜生物科技有限公司

3.2.2 实验设备及仪器

表 3-2 实验设备

Table 3-2 Experimental equipment

设备名称	型号	厂家
电子天平	JY1002	上海精密科学仪器有限公司
种子发芽箱	YRG-150	上海合恒仪器设备有限公司
真空冷冻干燥机	LGJ-12	北京松源华兴科技有限公司
高速粉碎机	FW100	天津市斯泰特仪器有限公司

设备名称	型号	厂家
超声波清洗机	030S	深圳市超洁科技实业有限公司
台式高速冷冻型微量离心机	D3024R	北京大龙兴创实验仪器有限公司
酶标仪	1510	上海赛默飞世尔仪器有限公司
紫外分光光度计	UV-520	上海元析仪器有限公司
pH 计	SX-610	上海三信仪表厂

3.2.3 实验方法

3.2.3.1 油菜素内酯处理

油菜素内酯溶液处理青稞籽粒同 2.2.4.1

3.2.3.2 样品液的提取

β -葡聚糖以及 GABA 样品的提取同 2.2.4.6

3.2.3.2 支链淀粉与直链淀粉含量的测定

青稞中直链淀粉与支链淀粉的测定参考^[94] T/QAS 076-2022 的标准进行测定, 采用双波长法来测定萌发青稞中的总淀粉的含量。首先按照 T/QAS 076-2022 中说明标准绘制直链淀粉与支链淀粉的标准曲线, 然后取样品液 1.0 mL 样品溶液分别装入 25 mL 烧杯中, 其中一份作为样品空白对照液, 另一份作为样品测定液。每个烧杯中加入 15 mL 纯水, 并使用 0.1 mol/L 盐酸溶液将 pH 调节至 3.0。然后向样品测定液中加入 0.75 mL 碘试剂, 空白及对照液中不加。然后将两个烧杯中的溶液分别转移至两个 25 mL 容量瓶中, 将烧杯用水洗涤 3 次后, 将洗涤液一并转移至相应的容量瓶中, 最后加水稀释至刻度, 并摇匀混合。静置 5 min 后分别在 624 nm、425 nm 波长处测定直链淀粉吸光度, 在 536 nm、750 nm 波长处测定支链淀粉吸光度, 最后根据吸光度值的差值通过标准曲线计算出样品中直链淀粉以及支链淀粉的含量, 二者之和即为总淀粉的含量。

3.2.3.3 总黄酮含量的测定

总黄酮含量的测定参考徐宁莉^[95]等人的方法并略作修改。从 3.2.3.2 中提取的样液中取 0.5 mL 后, 随后将其与 2 mL 超纯水和 0.3 mL 5 % 亚硝酸钠溶液混合。混合后静置 6 分钟, 随后加入 0.3 毫升 10 % 硝酸铝溶液, 再次静置 6 分钟。接着加入 2 mL 浓度为 1 mol/L 的氢氧化钠, 然后将混合物旋转并静置 10 分钟。然后立即使用紫外分光光度计在 510 nm 处测量吸光度。以芦丁浓度为横坐标,

吸光值为纵坐标绘制标准曲线计算样品中总黄酮的含量。

3.2.3.4 总酚含量的测定

总酚含量的测定参考 Shen^[96]等人的方法并略作修改,采用比色法进行测定。首先取样品液 0.2 mL 依次添加 1 mL 福林-酚试剂以及 0.5 mL 7% 碳酸钠溶液。并于室温避光下静置 30 min,然后在 765 nm 处测量样品的吸光度值,以没食子酸浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线计算样品中总酚的含量。

3.2.3.5 β -葡聚糖含量的测定

首先,从取 3.2.3.2 中的提取液,然后通过 PLANT β -GLUCANS ELISA KIT 试剂盒来测定样品中 β -葡聚糖含量。操作步骤严格按照试剂盒说明书所述进行,以标准品浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线并计算样品中 β -葡聚糖的含量。

3.2.3.6 γ -氨基丁酸 (GABA) 含量的测定

操作步骤同 3.2.3.5,通过 PLANT GABA ELISA KIT 试剂盒来测定样品中 GABA 的含量,操作步骤严格按照试剂盒说明书所述进行,以标准品浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线并计算样品中 GABA 的含量。

3.2.3.7 丙二醛 (MDA) 含量的测定

萌发青稞中丙二醛 (MDA) 含量的测定采用硫代巴比妥酸法进行测定^[97]。首先取萌发青稞幼苗 2 g 置于研钵中,加入 2 mL 5 % 的三氯乙酸溶液充分研磨后转入离心管,然后用 3 mL 5 % 三氯乙酸溶液洗涤研钵合并样液到离心管中。将匀浆在 3000 r/min 台式高速冷冻型微量离心机中离心 10 min,然后取上清液 2 mL 加入 2 mL 0.6 % 的硫代巴比妥溶液,摇匀后在沸水浴中反应 15 min 后离心,取上清液到 532 nm、600 nm 以及 450 nm 处测定吸光度值,并根据公式计算青稞幼苗中 MDA 的含量。

3.2.4 数据与分析

所有样本均设置 3 组重复,结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 SPSS22.0 软件进行数据分析处理;并用 Origin2018 软件进行绘制图表。

3.3 结果与分析

3.3.1 油菜素内酯对萌发青稞中 β -葡聚糖含量的影响

β -葡聚糖是一种广泛存在于谷物的一种富有极高营养价值的可溶性膳食纤维

维物^[98]。其具有良好的理化性质以及生理活性，能够改变人体肠道中微生物群的组成以及通过形成凝胶来减缓淀粉的消化以及葡萄糖的吸收速度，这对减少餐后血糖反应具有着重要的意义^[99]。在本次研究中，如图 3-1 我们能够观察到，在青稞种子浸种开始萌发后，对照组与处理组中青稞幼苗中整体 β -葡聚糖水平在第一天达到最高，其中在 100 μmol 的外源油菜素内酯处理作用下， β -葡聚糖的含量达到最大，为 $13.07 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$ ，相较对照组提高 1.88 $\mu\text{g/g}$ 左右。然后随着发芽时间的延长，青稞幼苗中 β -葡聚糖的含量开始逐渐下降。而这，或许与油菜素内酯能够调控 β -葡聚糖的合成有关，在后面第四章的实验内容中，通过转录组学，我们验证了油菜素内酯的这一作用。这与 Al-Ansi 等^[100]人的研究相似，他们报道了在青稞萌发过程中， β -葡聚糖的浓度会略有下降。而这可能与谷物发芽过程当中一些酶类的激活所导致的谷物中淀粉类物质受到破坏有关^[101]。有趣的是，我们发现在油菜素内酯处理过后，萌发青稞中 β -葡聚糖较对照组都有明显的提升，并且随着萌发时间的延长， β -葡聚糖被降解的作用也得到了一定缓解。目前，有关油菜素内酯调节植物当中 β -葡聚糖的研究鲜有报道，我们猜测这可能与油菜素内酯对一些淀粉酶、聚糖酶的调节有关。袁红梅等^[102]研究了在 NaCl 胁迫下，油菜素内酯对亚麻种子萌发生理特性的影响，得出了外源油菜素内酯的处理能够提高 β -1,3-葡聚糖酶等酶活性的结论，这也许是 BRs 能够提高青稞籽粒中 β -葡聚糖的含量以及缓解萌发青稞中 β -葡聚糖降解的机制。

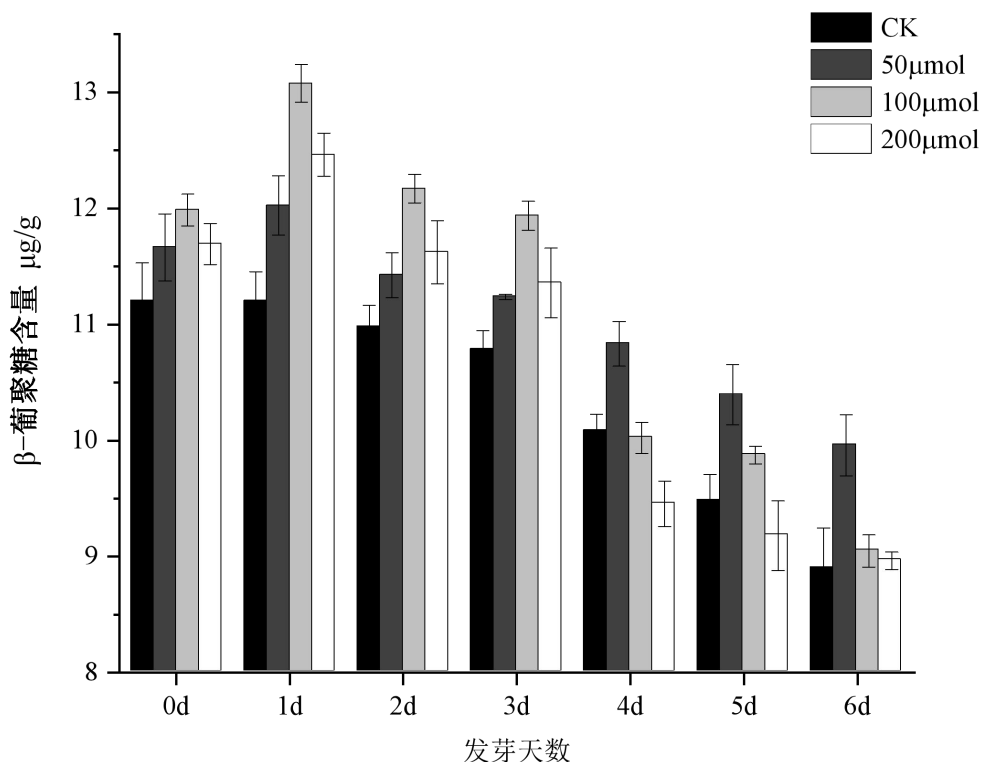


图 3-1 不同浓度油菜素内酯处理对萌发青稞中 β -葡聚糖含量的影响

Fig. 3-1 Effect of different concentrations of brassinolide treatments on β -glucan content in sprouted barley

3.3.2 油菜素内酯对萌发青稞中 GABA 含量的影响

在本研究当中，我们研究了外源油菜素内酯处理对萌发青稞中 GABA 含量变化的影响，结果如图 3-2 所示。随着发芽时间的延长，青稞中 GABA 的含量开始逐渐上升，且 200 μmol 浓度下油菜素内酯处理效果最好，在第 5 天时 GABA 含量来到最大，为 $16.80 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$ ，相较对照提升了 $2.34 \mu\text{g/g}$ 。萌发处理能够有效提升青稞幼苗当中 GABA 的含量。而研究表明，这一过程中 GABA 含量的增加与谷氨酸脱羧酶（GAD）的激活有着密切的关系，GAD 能够在种子萌发过程当中将 L-谷氨酸催化生产 GABA^[103]。油菜素内酯对植物的生长促进作用以及生理代谢调节作用已经得到了广泛的报道，而目前有关外源油菜素内酯对于植物中 GABA 含量影响的研究还很有限。Nejad 等^[104]通过实验发现，BRs 的预处理能够显著改善南瓜幼苗在盐胁迫下所受到的不利影响，并且南瓜幼苗中 GABA 的含量得到了显著的提升。谷氨酸是 GABA 的前体物质，Xu^[105]的研究结果表明，油菜素内酯能够参与诱导谷氨酸合成的生物过程当中，这也许是目前能够解释外源油菜素内酯处理下青稞中 GABA 含量能够得到提升的一项证据。

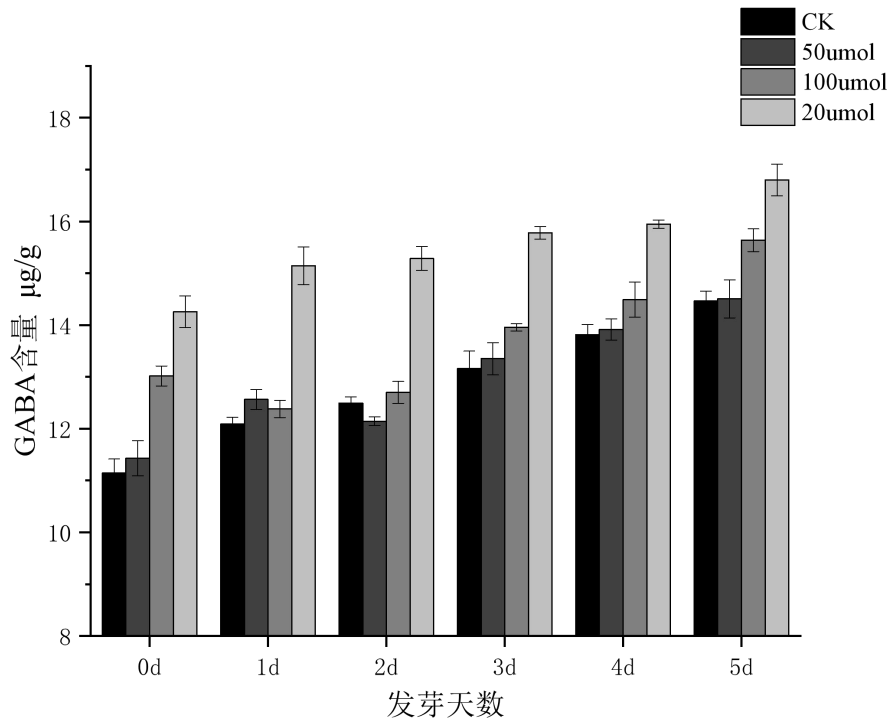


图 3-2 不同浓度油菜素内酯处理对萌发青稞中 GABA 含量的影响

Fig. 3-2 Effect of different concentrations of brassinolide treatments on GABA content in germinating barley

3.3.3 油菜素内酯对萌发青稞中总黄酮含量的影响

下图 3-3 为不同浓度油菜素内酯处理对萌发青稞中总黄酮含量的影响。结果表明，总黄酮含量随着青稞种子萌发时间的延续而不断增加，到第五天时达到最大。总体上来看，50 μmol 以及 100 μmol 外源油菜素内酯成功促进了萌发青稞中总黄酮的积累，而 200 μmol 对其作用效果不太明显。其中，以 100 μmol 外源油菜素内酯处理下的萌发青稞中，总黄酮含量达到最大，为 $8.33 \pm 0.18 \text{ mg/g}$ ，是无菌水处理组（ $4.68 \pm 0.24 \text{ mg/g}$, CK）的 1.78 倍。黄酮类化合物是一类具有高度多样化性，且普遍存在于高等植物当中的次生代谢物，目前已鉴定其种类多达 9000 种以上。黄酮类化合物对植物在生理、生物化学和生态学方面具有着广泛的功能，如防护紫外线、调节花的颜色、调节种间相互作用以及植物防御等等^[106]。近年来，研究发现油菜素内酯对于植物当中黄酮类化合物的生物合成具有着显著的调控作用^[107]。孙嘉华等^[108]的研究表明，对不同葡萄果实施用外源 24-表油菜素内酯之后，葡萄果实中的总黄酮含量相比未施用的显著提高了 37.9 %；Zheng 等^[109]人也得到相似的研究结论，他们发现外源油菜素内酯的处理能够上调与类

黄酮生物合成与转运结构有关基因表达水平,从而来促进水果当中黄酮类化合物的积累。

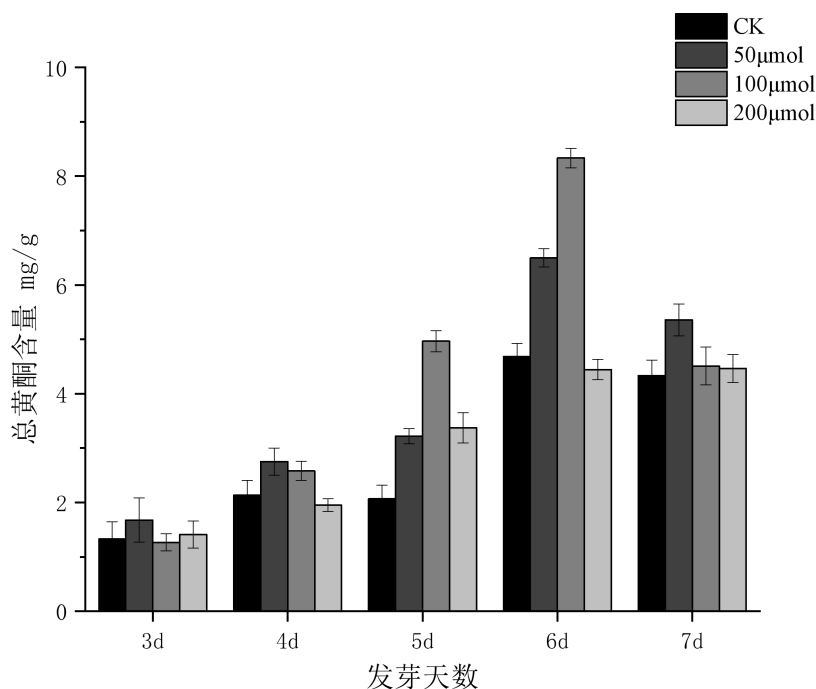


图 3-3 不同浓度油菜素内酯处理对萌发青稞中总黄酮含量的影响

Fig. 3-3 Effect of different concentrations of brassinolide treatments on total flavonoid content in sprouted barley

3.3.4 油菜素内酯对萌发青稞中总酚含量的影响

油菜素内酯对萌发青稞中总酚含量的影响如下图 3-4, 和 3.4.3 中总黄酮所得结果相似, 随着青稞籽粒萌发期的延长, 青稞幼苗中整体总酚的含量呈现先升高后下降的趋势。而相较于对照无菌水处理组来看, 外源油菜素内酯的处理能够在一定程度上刺激青稞中总酚的积累, 最能体现的就在 50 μmol 的油菜素内酯处理下, 萌发青稞在第五天时积累总酚的含量达 $2.88 \pm 0.10 \text{ mg/g}$, 相较对照组提升 0.31 mg/g 左右。酚类物质是所有植物中普遍存在的次生代谢产物, 它包括单酚类、羟基苯甲酸和肉桂酸衍生物、类黄酮、香豆酚和单宁等。油菜素内酯作为调节植物生理代谢具有重要作用的一种调节剂, 近年来其在提高植物中总酚等酚类物质的作用被很多研究所报道^[110]。Wu^[111]在他们的研究中发现了油菜素内酯处理能够显著提高采后绿竹笋中总酚的含量以及抗氧化性。而 Xue 等^[112]的研究也表明了外源油菜素内酯处理在显著提高豆芽中总酚含量的作用。而导致这一现象的原因, 可能是油菜素内酯能够促进一些与酚类代谢有关的基因的表达有关。

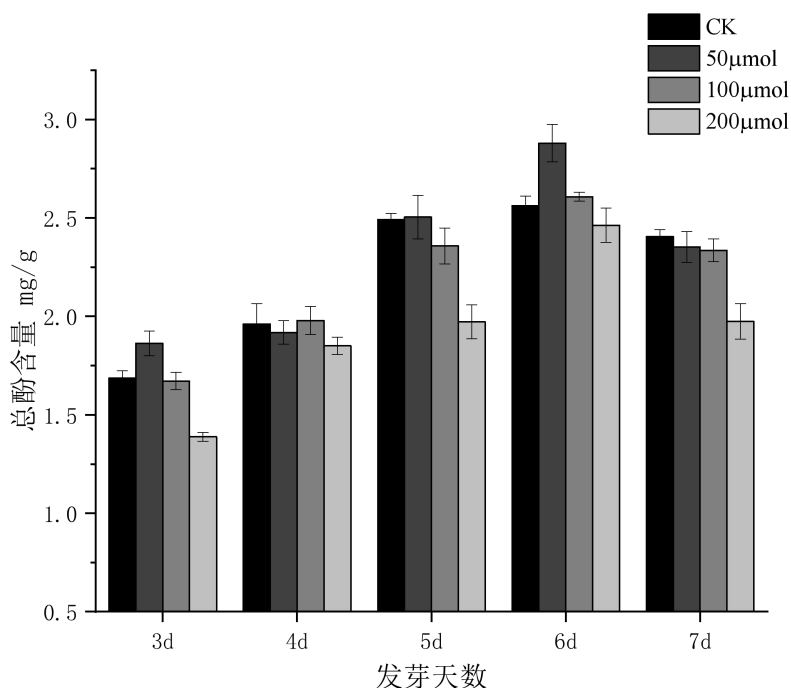


图 3-4 不同浓度油菜素内酯处理对萌发青稞中总酚含量的影响

Fig. 3-4 Effect of different concentrations of brassinolide treatments on total phenol content in sprouted barley

3.3.5 油菜素内酯对萌发青稞中总淀粉含量的影响

青稞种子的萌发能够显著改变其淀粉的结构、理化性质以及形态特征^[113]。在本次的研究当中，随着青稞籽粒萌发时间的延长，直链淀粉与支链淀粉在含量的变化上表现出了不同的变化趋势。首先是直链淀粉，萌发导致直链淀粉的含量不断下降，这在对照以及外源油菜素内酯处理组中都表现出了这种趋势。而对于支链淀粉，对照组与外源油菜素内酯处理组中支链淀粉的含量都表现出先上升后下降的趋势。而值得注意的是，在直链淀粉与支链淀粉含量变化过程中，外源油菜素内酯处理下的青稞萌发幼苗当中，淀粉的分解作用都得到了一定的缓解，尤其是在 200 μmol 下表现效果最好，这说明了外源油菜素内酯能够在青稞萌发过程中，一定程度上阻止其幼苗当中淀粉的分解作用。这与 Guo 等^[114]的研究结果相似，他们在对油菜素内酯(BR)对球茎形成和发育的调控作用的研究中发现，外源油菜素内酯处理能够降低 BMA (β -淀粉酶) 以及 ISA 基因的表达来降低淀粉向麦芽糖的分解代谢作用。然而，当植物受到非生物胁迫时，油菜素内酯又会表现出激活 BMA 信号来加速将淀粉分解为糖类来抵御胁迫所带来的侵害^[115]。

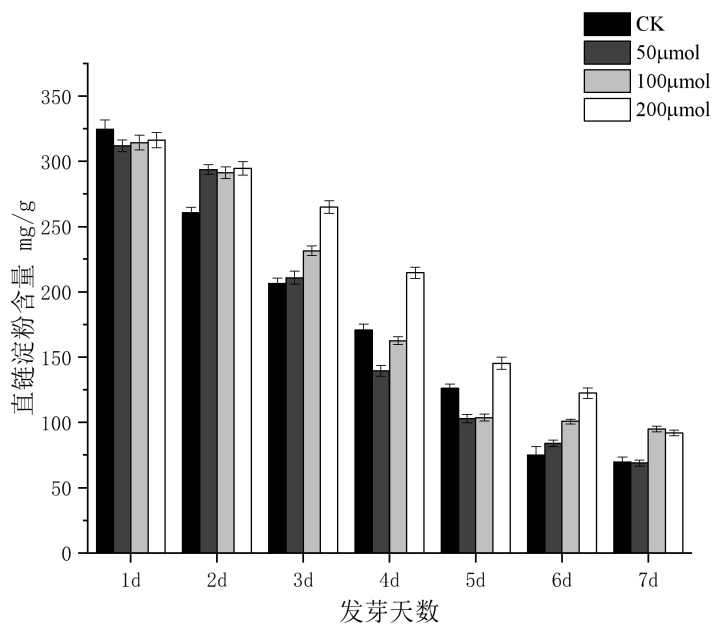


图 3-5 不同浓度油菜素内酯处理对萌发青稞中直链淀粉含量的影响

Fig. 3-5 Effect of different concentrations of brassinolide treatment on the content of straight-chain starch in sprouted barley

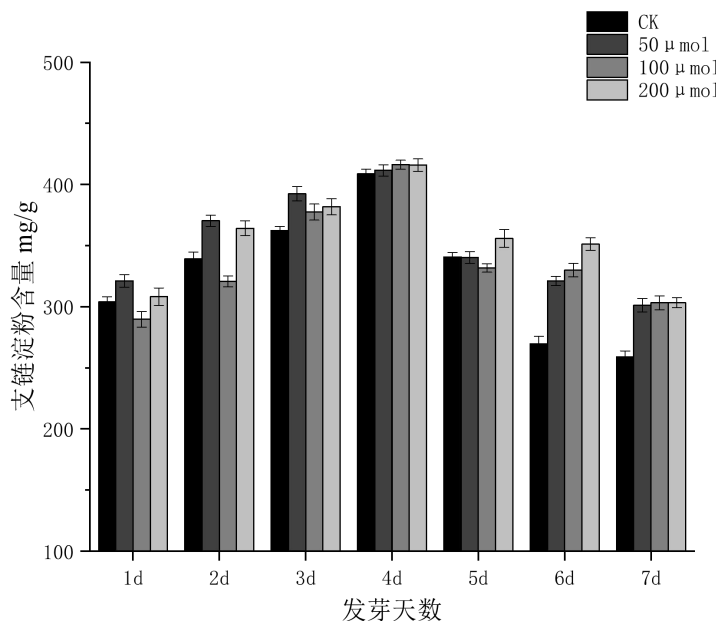


图 3-6 不同浓度油菜素内酯处理对萌发青稞中支链淀粉含量的影响

Fig. 3-6 Effect of different concentrations of brassinolide treatment on branched-chain starch content in sprouted barley

3.3.6 油菜素内酯对萌发青稞中丙二醛（MDA）含量的影响

丙二醛作为一种多不饱和脂肪酸氧化以及花生四烯酸代谢的产物,是植物体内发生氧化应激的生物标志物之一。当植物在从发育过程走向衰老时,其体内会伴随着脂质的氧化作用,而 MDA 则能够反应这一过程的强弱^[116]。在本次的研究中,我们观察到随着青稞籽粒萌发天数的增加,青稞中 MDA 的含量逐渐升高。种子在萌发的过程当中,由于与代谢有关的生理活动的增加以及环境因素的影响,会导致膜脂的过氧化作用增强,因而导致植物中 MDA 含量的增加^[117]。本次的研究中,我们发现在外源油菜素内酯溶液的处理下,青稞幼苗中的 MDA 的含量随着时间的延长而增加,然而相较于对照组,其含量明显普遍更低,这也许说明了油菜素内酯对于防止种子萌发过程当中 MDA 的增加或脂质的氧化具有一定的抑制作用。Shu^[118]等人报道了油菜素内酯在 NaCl 胁迫下对对棉花生长、Na⁺积累、脯氨酸含量、MDA 含量、抗氧化酶活性和棉花根系差异表达基因(DEGs)的影响,发现油菜素内酯通过改善棉花根系活性,以及降低 MDA 等物质的含量来缓解 NaCl;此外, Ahammed^[119]也报道了外源施用油菜素内酯可以降低丙二醛(MDA)含量以让水稻适应盐胁迫。由此看来,外源施用油菜素内酯能够一定程度上阻止青稞幼苗在萌发过程当中增强其抗氧化性,减缓脂质的氧化效应。

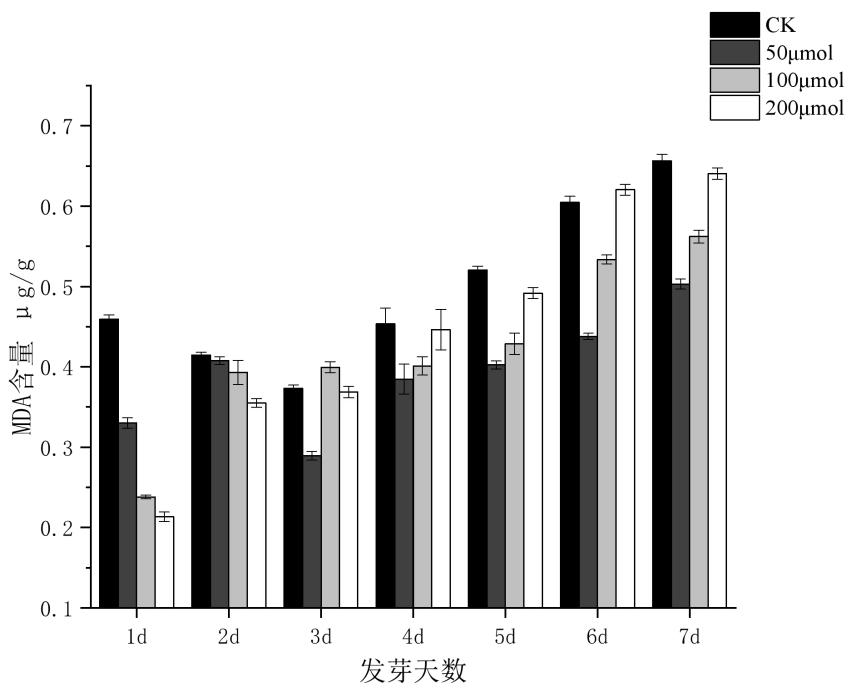


图 3-7 不同浓度油菜素内酯处理对萌发青稞中丙二醛含量的影响

Fig. 3-7 Effect of different concentrations of brassinolide treatment on malondialdehyde content in sprouting barley

3.4 本章小结

本章研究了在不同油菜素内酯溶液 0、50 μmol 、100 μmol 以及 200 μmol 的浓度下，对青稞幼苗中一些功能物质的影响，结果表明：外源油菜素内酯处理对青稞中 β -葡聚糖、 γ -氨基丁酸、总酚、总黄酮、总淀粉以及丙二醛都产生了一定的影响。外源油菜素内酯在 100 μmol 浓度下能够促进青稞幼苗在第一天积累 β -葡聚糖含量达到最大，为 $13.07 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$ ，相较对照组提高 1.88 $\mu\text{g/g}$ 左右；对萌发青稞幼苗中 GABA 含量积累也具有一定的促进作用，在 200 μmol 浓度下青稞萌发第 5 天时含量最大，为 $16.80 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$ ，相较对照提升了 2.34 $\mu\text{g/g}$ ；外源油菜素内酯处理对于萌发青稞幼苗中总酚总黄酮的积累也具有一定的促进作用，分别在 100 μmol 浓度处理下第六天总黄酮含量达到最大，为 $8.33 \pm 0.18 \text{ mg/g}$ ，是无菌水处理组（ $4.68 \pm 0.24 \text{ mg/g}$ ，CK）的 1.78 倍以及在 50 μmol 的浓度处理下，在第五天时积累总酚的含量达最大为 $2.88 \pm 0.10 \text{ mg/g}$ ，相较对照组提升 0.31 mg/g 左右；同时，油菜素内酯的处理对萌发青稞中直链淀粉与支链淀粉的含量具有一定的作用，表现为在 200 μmol 对青稞中阻止其幼苗当中直链淀粉与支链淀粉的分解作用；此外，外源油菜素内酯能够表现出对青稞籽粒在萌发过程产生丙二醛的抑制作用，能够一定程度上缓解青稞在萌发过程中的脂质氧化。

第4章 外源油菜素内酯影响青稞褪黑素富集的转录组分析

4.1 前言

转录组是指研究特定某一功能状态下细胞所能产生的所有转录产物的几何，对于帮助我们理解生物体生长发育机制以及疾病的发生机制上发挥着重要的作用。如今，转录组的主要测序方法—RNA-seq 凭借其灵敏度高、通量大以及速度快等优势在植物领域内取得了广泛的应用拓展。

转录组学在植物方面的应用已有很多报道，如 Shi^[120]借助转录组学，成功揭示了褪黑素通过调节参与氮代谢、主要碳水化合物代谢、三羧酸(TCA)/org 转化、运输、激素代谢、金属处理、氧化还原和次生代谢的基因的过度表达来提高百慕大草的抗盐、抗寒性；Cao 等^[121]通过转录组学的方法，发现褪黑素能够通过调节谷胱甘肽代谢和上调部分金属离子转运基因来缓解苹果受到的营养胁迫并促进对营养物质的吸收和利用；Hu 等^[122]通过转录组学，揭示了褪黑素在调节甜瓜种子的生长发育与代谢来应对重金属铜的胁迫。以上表明了，转录组学作为一种有效的方法，在揭示植物中褪黑素的生理作用方面发挥了重要的作用。

本章实验采用 RNA-seq 的转录组的方法，对三组样本 BR、C、S 进行转录组测序，定量分析三组之间差异表达基因，并找到外源油菜素内酯作用下，青稞幼苗中与褪黑素生物合成有关的关键基因。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验材料

同 2.2.1。

4.2.2 实验设计

本实验采用青稞种子为原材料，在 100 μmol 浓度的油菜素内酯溶液浸种 10 h 后进行萌发实验，以无菌水处理以及青稞籽粒作为对照。收取实验组与对照组在第三天的芽苗以及青稞籽粒作为后续转录组实验材料。收取样本时候，立即放入液氮冷冻，存于-80℃冰箱中用于后续测序分析。油菜素内酯处理、对照无菌水处理以及青稞籽粒分别标记为 BR、C、S。

4.2.3 RNA 提取和文库构建

青稞样本采用 CTAB-PBIOZOL 进行提取总 DNA。提取成功后的 RNA 加入 50 μ L DEPC 处理过的水溶解。随后,使用 Qubit 荧光定量仪和 Qsep400 高通量生物片段分析仪对总 RNA 进行了鉴定和定量。

mRNA 文库的构建分为以下几个步骤: 1、利用真核生物大部分 mRNA 都带有 polyA 尾的结构特征,通过 Oligo(dT)磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA; 2、然后将纯化后的 mRNA 在适当温度下用片段缓冲液裂解成小片段; 3、使用随机六聚体引物反转录生成第一链 cDNA; 4、合成第二链 cDNA (链特异性文库: 二链合成时,使用 dUTP 代替 dTTP,使 cDNA 第二链中; 5、进行测序接头连接(Adapter Ligation),连接完成后进行 DNA 磁珠纯化和片段选择,获得 250-350bp 的插入片段的文库; 6、将连接产物进行 PCR 扩增,并再次使用 DNA 磁珠纯化扩增产物,用 Nuclear Free Water 溶解产物; 7、文库初步构建完成后,先使用 Qubit 荧光定量仪进行浓度检测,随后使用 Qsep400 高通量生物片段分析仪进行片段大小检测; 8、将 PCR 获得的双链 DNA 文库进行单链环化处理,得到单链环状 DNA 文库; 9、最终文库上机前用 phi29 进行扩增,制成一个分子 300 多个拷贝的 DNA 纳米球(DNB),将 DNB 加载到测序芯片中,在 BGI 测序平台上进行测序。本次测序分析由武汉迈维代谢生物技术公司完成。

4.2.4 上机测序

待样品库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序,并产生 150bp 配对末端读数。测序的基本原理是边合成边测序(Sequencing by Synthesis)。在测序的 flow cell 中加入四种荧光标记的 dNTP、DNA 聚合酶以及接头引物进行扩增,在每一个测序簇延伸互补链时,每加入一个被荧光标记的 dNTP 就能释放出相对应的荧光,测序仪通过捕获荧光信号,并通过计算机软件将光信号转化为测序峰,从而获得待测片段的序列信息。

4.3 转录组数据统计与分析

4.3.1 数据质控

使用 fastp 对原始数据进行过滤,主要去除带接头(adapter)的 reads; 当任一测序 reads 中 N 含量超过该 reads 碱基数的 10 %时,去除此 paired reads; 当任一测序 reads 中含有的低质量($Q \leq 20$)碱基数超过该条 reads 碱基数的 50%

时，去除此 paired reads。后续所有分析均是基于 clean reads。

4.3.2 转录本组装及预测

使用 Trinity 对 clean reads 进行转录本组装，使用 Corset 对组装得到的转录本进行聚类去冗余。然后使用 TransDecoder 对 Trinity 组装得到的转录本进行 CDS 预测，得到转录本对应的氨基酸序列。

4.3.3 对基因表达水平进行定量

每千碱基的转录物片段数（FPKM）是目前最常用的估计基因表达水平的方法，本次转录实验以 FPKM 作为基因表达的指标。使用 RSEM 软件计算转录本的表达量，然后根据转录本长度计算每个转录本的 FPKM。FPKM 计算公式如下：

$$\text{FPKM} = \frac{\text{mapped fragments of transcript}}{\text{Total Count of mapped fragments (Millions)} \times \text{Length of transcript (kb)}}$$

4.3.4 差异基因的筛选及分析

对于样本的生物学重复使用 DESeq2 进行两组之间的差异表达分析并获得两个生物学条件之间的差异表达基因集。使用 Benjamini & Hochberg 方法校正 P 值。校正后的 P 值以及 $|\log_2\text{foldchange}|$ 作为显著差异表达的阈值。差异基因的筛选条件为 $|\log_2\text{Fold Change}| \geq 1$ ，且 $\text{FDR} < 0.05$ 。

通过 GO 和 KEGG 富集分析鉴定差异基因的功能，并利用 WGCNA 进行加权基因共表达网络分析，将表达模式相同的基因聚类到不同的模块当中。

4.3.5 数据处理

使用 Excel2016 对数据进行处理，使用 SPSS22.0 进行方差分析，以 P 值 < 0.05 为差异显著的标准，使用 Origin2018 绘图。转录组数据的处理及绘图均在迈维代谢云平台上完成。

4.4 结果与分析

4.4.1 转录组测序质量控制与组装结果分析

对萌发青稞幼苗在油菜素内酯溶液（100 μmol ）处理、无菌水对照处理以及无任何处理的青稞籽粒进行转录组测序。在经过原始数据过滤、测序错误率检查、GC 含量分布检查后，获得后续分析使用的 clean reads。如下表所示，在经过质量控制之后，包含三个技术重复的 3 组样品共得到 74.09Gb 的 Clean Data，各个样品中 Clean Data 均在 7Gb 以上。Q20 碱基百分比在 98.04 以上，Q30 碱基百分

比在 94.46 以上。GC 含量超过 55.03 %。以上表明了这三组样品的转录组测序结果符合要求，能够进行后续一步的分析。

表 4-1 青稞籽粒转录组测序评估统计

Table 4-1 Statistics of transcriptome sequencing assessment of barley kernels

Sample	Raw Reads	Clean Reads	Clean Base(G)	Error Rate (%)	Q20(%)	Q30(%)	GC Content (%)
BR-1	52903730	49955916	7.49	0.01	98.36	95.39	55.47
BR-2	70654166	67140896	10.07	0.01	98.56	95.93	55.45
BR-3	61450992	58215438	8.73	0.01	98.51	95.75	55.56
C-1	58978472	54761510	8.21	0.01	98.44	95.62	55.4
C-2	55729376	51590116	7.74	0.01	98.04	94.46	55.45
C-3	49794548	46850750	7.03	0.01	98.37	95.37	55.4
S-1	63441004	59077154	8.86	0.01	98.24	95.14	55.03
S-2	55975890	52535660	7.88	0.01	98.29	95.24	54.66
S-3	58193530	53866672	8.08	0.01	98.28	95.25	55.06

4.4.2 基因表达定量分析

通过计算三个处理组（BR、C、S）中所有基因的 FPKM 值后，绘制基因表达量箱线图以及基因表达量分布图（图 4-1）。如图 4-1 A 中，图中横坐标代表不同的样品；纵坐标表示样品表达量 FPKM 的对数值。图 4-2 B 中，不同颜色的曲线代表不同的样品，曲线上点的横坐标表示对应样品 FPKM 的对数值，点的纵坐标表示概率密度。由上图可以看出，三个比较组组内平行基因的表达水平在同一水平线上基本相似，而三组组间之间的基因表达量具有一定的差异。

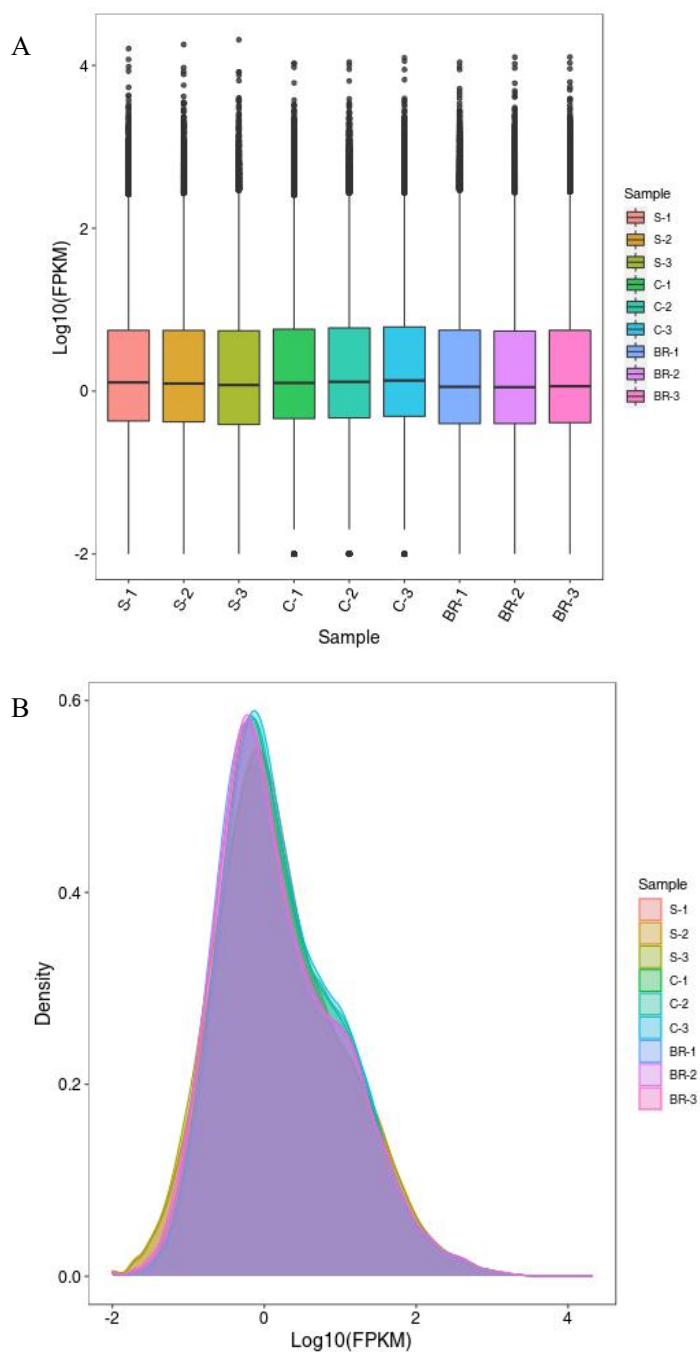


图 4-1 基因表达量箱线图（A）与基因表达量密度分布图（B）

Fig. 4-1 Box line plot of gene expression (A) vs. density distribution of gene expression (B)

4.4.3 样品相关性分析及主成分分析

皮尔逊相关性分析是一种衡量变量之间线性关系强度和方向的一种统计学方法，如今被越来越广泛应用到生物学重复性评价当中。对于 BR、C 和 S 三组来看，同一样品处理组之间的皮尔逊系数均在 0.97 以上，生物学重复样品之间的相对系数较高，这说明了三组青稞籽粒转录组样品的数据结果较为可靠。

主成分分析（PCA）可以直观的反应各个样本之间的相似性。如果样本的点聚在一起，那么就说明这几个样本之间的相似性高。生物学重复内样品聚在一起，说明组内重复性好。将来自高通量仪器分析的数据通过主成分分析（PCA）可视化表示，可以揭示生物样品聚类的相似性和差异性。因此，采用 PCA 对收集到的转录组数据进行识别，可以很好的观察到三组样品（BR、C、S）之间的差异。如图 4-3 所示，第一主成分将 9 个样品分成了两组，S 组与 BR、C 集合组，可信度为 53.77 %；第二主成分将 9 个样品分成了三组，可信度为 13.35 %。BR、C 和 S 三组样品较好的被分成了三个区域，并且各组样品的生物学重复分布紧密，组内差异较小，实验的数据较为稳定可靠。这表明了油菜素内酯处理对青稞籽粒中的转录组有着显著的影响。

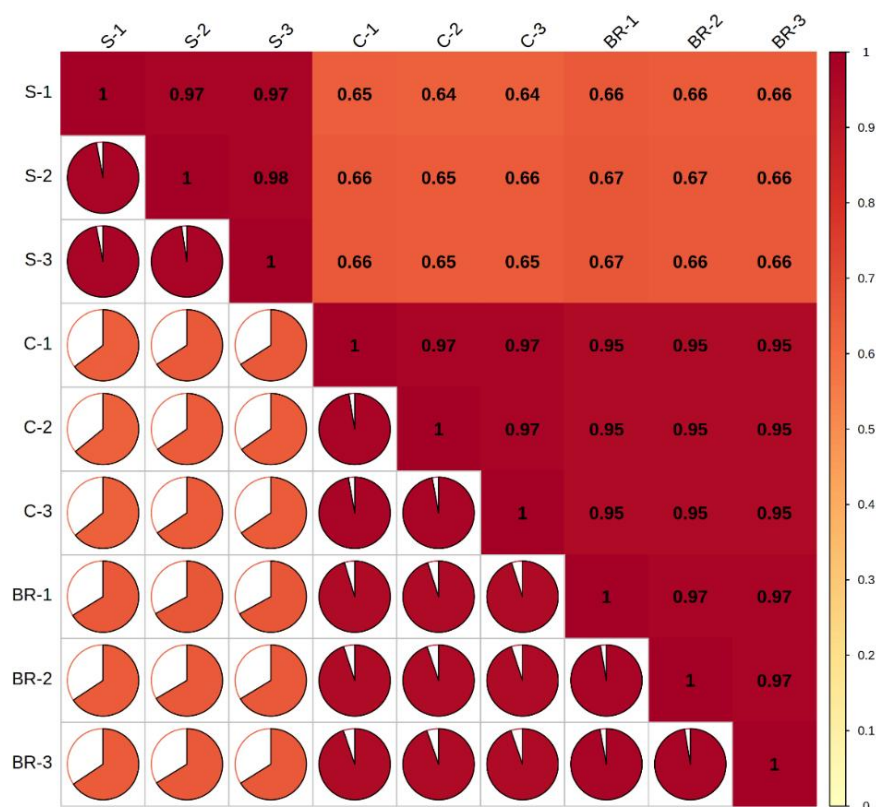


图 4-2 三组不同处理的青稞籽粒转录样本的相关性分析

Fig. 4-2 Correlation analysis of barley seed transcript samples from three different treatment groups

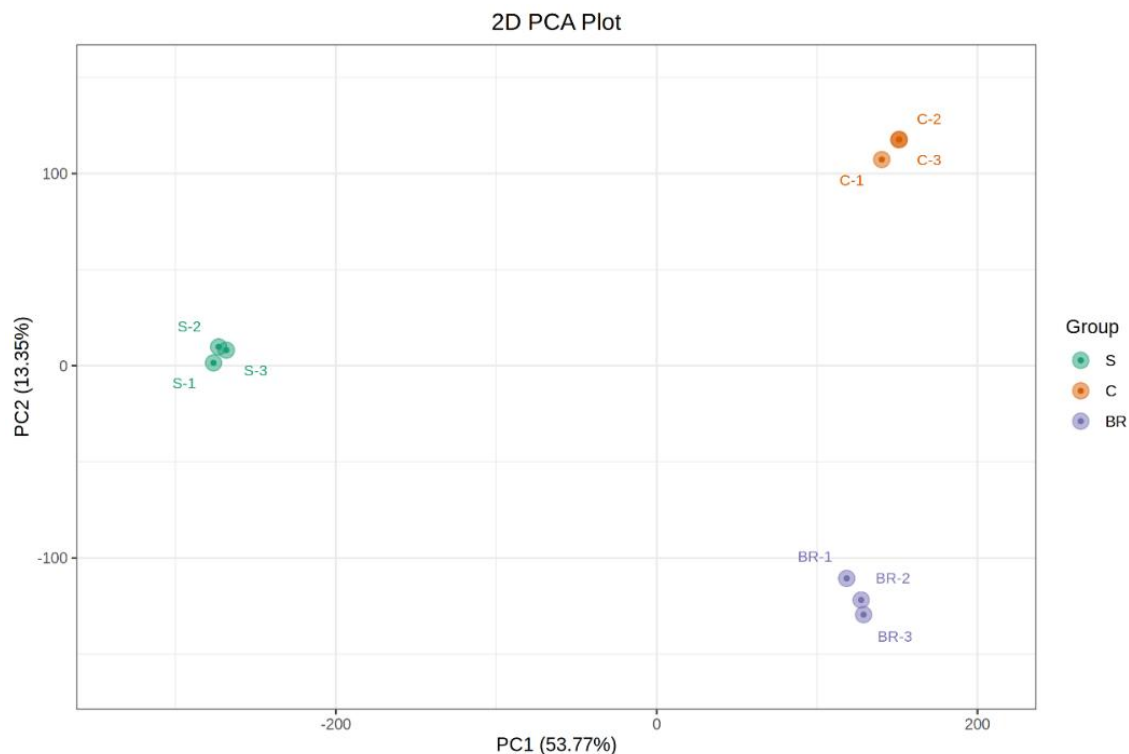


图 4-3 三组不同处理的青稞籽粒转录样本的主成分分析

Fig. 4-3 Principal component analysis of transcript samples from three groups of barley kernels with different treatments

4.4.4 基因功能注释

使用 DIAMOND BLASTX 软件将转录组组装所获取的基因序列与 KEGG、NR、Swiss-Prot、GO、COG/KOG、Trembl 数据库比对,对差异基因的氨基酸序列进行预测后使用 HMMER 软件与 Pfam 数据库进行比对,以获取差异基因的注释信息。将三组样本 (BR、C、S) 的青稞籽粒转录组信息在以下 6 大数据库中进行注释 (表 7),发现在 NR 数据库中的注释最多,共 64542 个基因,占总基因注释结果的 82.43 %;其次在三个常见的功能注释数据 KEGG、GO、Swiss-Prot 中分别注释了 4470.2 个 (57.09 %)、48342 个 (61.74) 以及 42537 个 (54.43 %)。以上结果表明了,本次测序的数据质量可靠,可用于后续进一步的分析。

表 4-2 青稞籽粒转录组功能注释

Table 4-2 Functional annotation of barley seed transcriptome

数据库	基因数量	占比
Database	Number of Genes	Percentage (%)

数据库	基因数量	占比
Database	Number of Genes	Percentage (%)
KEGG	44702	57.09
NR	64542	82.43
Swiss-Prot	42537	54.33
TrEMBL	62649	80.01
KOG	33339	42.58
GO	48342	61.74
Pfam	43602	55.69
Annotated in at least one Database	66661	85.14
Total Unigenes	78297	100

4.4.5 不同青稞籽粒样本差异表达基因分析

在使用 DESeq2 进行差异表达基因分析后, 以 $|\log_2FC| \geq 1$; $P\text{-value} \leq 0.05$ 作为筛选条件后, 我们统计得到了每组的差异基因总数、上调基因数和下调基因数, 具体数据如下表所示: 在转录的样本中, 100 μmol 油菜素内酯处理萌发第三天的青稞籽粒与无菌水正常处理萌发第三天的青稞籽粒相比共有 3675 个差异基因, 其中上调的基因数量为 1014 个, 占 27.59%, 下调的基因数量为 2661 个, 占 72.41 %; 100 μmol 油菜素内酯处理第三天的青稞籽粒与无菌水正常处理无萌发的青稞籽粒相比共有 26001 个差异基因, 其中上调基因的数量为 14401 个, 占 55.38 %, 下调的基因数量为 11600 个, 占 44.62 %; 而无菌水正常处理萌发第三天的青稞籽粒与无菌水正常处理下的青稞籽粒相比, 共检测到 26753 个差异基因, 其中上调的基因数量为 15438 个, 占 57.70 %, 下调的基因数量为 11315 个, 占 43.30 %。

表 4-3 三个样本组间的差异表达基因数量

Table 4-3 Number of differentially expressed genes among the three sample groups

参数	差异表达基因对比	差异基因数目	上调表达基因	下调表达基
Parameter	组名称	Different	数目	因数目
	Different expressed	expressed	Up regulated	Down
	gene set	gene		regulated

参数	差异表达基因对比	差异基因数目	上调表达基因	下调表达基
Parameter	组名称	Different	数目	因数目
	Different expressed	expressed	Up regulated	Down
	gene set	gene		regulated
$ \log_2FC \geq 1$; P.value ≤ 0.05	BR vs. C	3675	1014	2661
$ \log_2FC \geq 1$; P.value ≤ 0.05	BR vs. S	26001	14401	11600
$ \log_2FC \geq 1$; P.value ≤ 0.05	C vs. S	26753	15438	11315

4.4.6 差异基因的筛选与分析

利用维恩图来分析三个样本组中差异基因的交叉表达情况。结果如图 4-4 所示，三组共有差异表达基因 1443 个。BR vs. C 与 BR vs. S 相比，共有的差异表达基因有 2071 个；BR vs. C 与 C vs. S 相比，共有的差异表达基因有 2673 个；而 BR vs. S 与 C vs. S 相比，共有差异表达基因 22520 个。通过对三组青稞籽粒样本进行差异基因分析，并使用 Z-score 对数据进行标准化处理后，我们进行了层次聚类分析。我们绘制了所有比较组合的差异基因的聚类热图，并展示了每个差异分组的聚类热图。具体结果如图 4-5 所示。S（无菌水正常处理无萌发）与 BR（100 μmol 油菜素内酯处理萌发第三天）、C（无菌水正常处理萌发第三天）两组在基因的上调及下调中差异明显，这表明了 S 组与 BR、C 两组在基因的表达上存在显著的差异；对于 BR 与 C 的比较来看，两组在下调基因的表达上类似，仅在上调部分存在一定的差异，这也与前文中有关不同青稞籽粒样本差异表达基因分析所得到的结果相同。

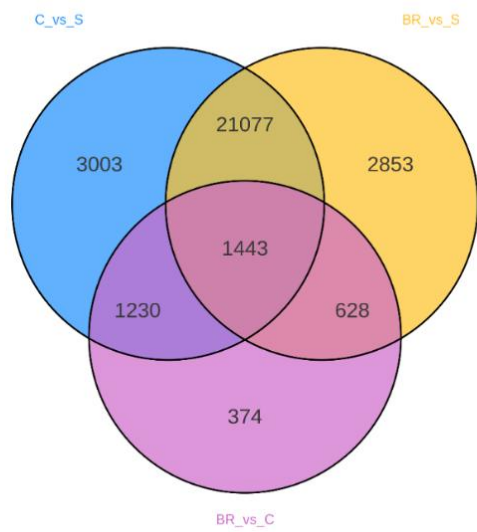


图 4-4 差异表达基因的维恩图分析

Fig. 4-4 Venn diagram analysis of differentially expressed genes

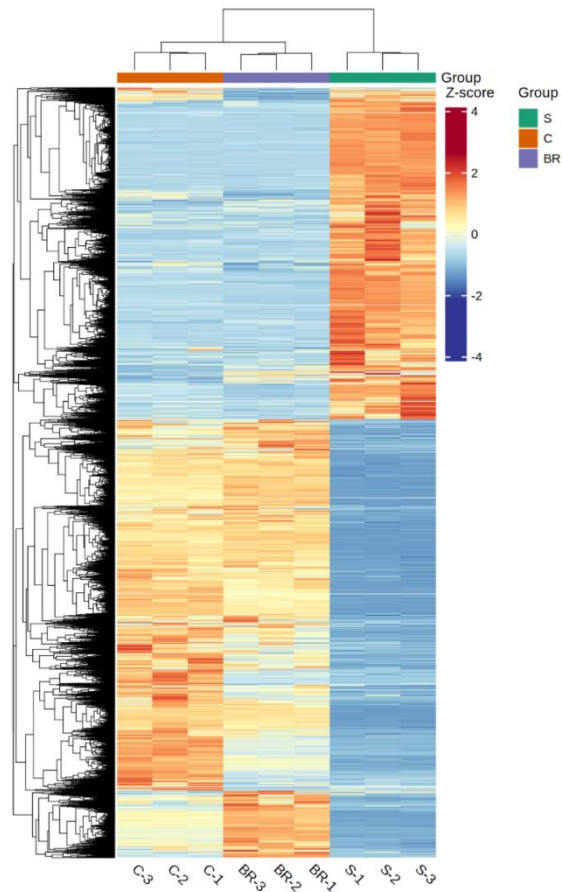


图 4-5 差异表达基因的聚类热图

Fig. 4-5 Clustering heat map of differentially expressed genes

注：横坐标表示样品名称及层次聚类结果，纵坐标表示差异基因及层次聚类结果。红色表示高表达，蓝色表示低表达。

4.4.7 差异表达基因的 GO 分析

对 BR vs. C 对比组中差异表达基因进行 GO 富集分析，结果如图 4-5。3675 个差异基因被注释到三个部分当中：生物过程（Biological process）、细胞组分（Cellular componen）以及分子功能（Molecular function）。在生物过程分类中，富集最为显著的功能是光合作用，光收集、有机化合物氧化的能量衍生、细胞呼吸、光合作用，采光、节律过程、有氧呼吸等过程当中；在细胞组分过程中，富集最为显著的功能是光合系统、胞质大核糖体亚基、小核糖体亚基、光合系统 II、细胞质小核糖体亚基；而在分析功能方面，富集最为显著的功能是未折叠蛋白结合、叶绿素结合、rRNA 结合、质子跨膜转运体活性、蛋白质自我结合蛋白质折叠伴侣以及 ATP 依赖性蛋白质折叠伴侣等。

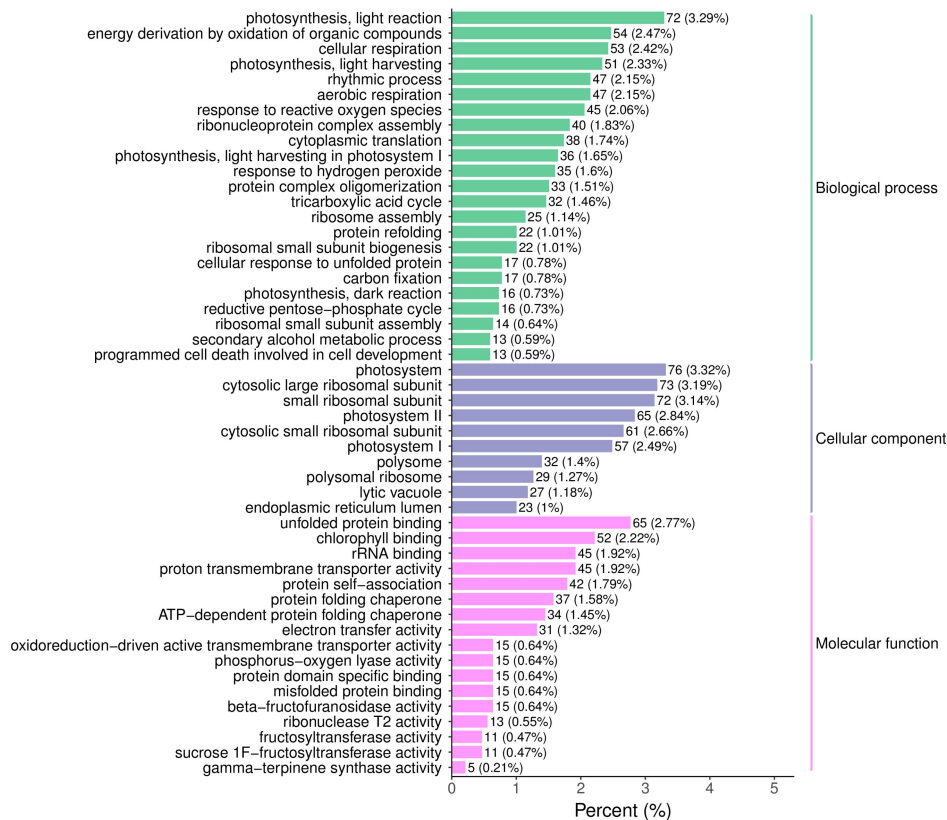


图 4-6 BR vs. C 对比组差异基因 GO 富集分析

Fig. 4-6 GO enrichment analysis of differential genes in the BR vs. C comparison group

而对 BR vs. S 对比组中差异表达基因进行 GO 富集分析，结果显示在生物过

程分类中富集最为显著的功能是过氧化氢代谢过程、叶绿体组织对伤口的反应、过氧化氢分解代谢过程、色素代谢过程、苯丙氨酸生物合成过程、细胞壁多糖代谢过程、对活性氧的反应、脂质定位脂质运输以及 β -葡聚糖代谢等过程；在细胞组分过程中，富集最为显著的功能是膜的锚定成分、质膜的锚定成分、质体类囊体内腔以及质体类囊体腔；而在分子功能过程中，富集最为显著的功能是以过氧化物为受体的氧化还原酶活性、过氧化物酶活性、葡萄糖基转移酶活性染色质的结构成分、O-酰基转移酶活性、葡聚糖内-1,3-beta-D-葡萄糖苷酶活性 O-甲基转移酶活性以及水通道活性（图 4-7）。

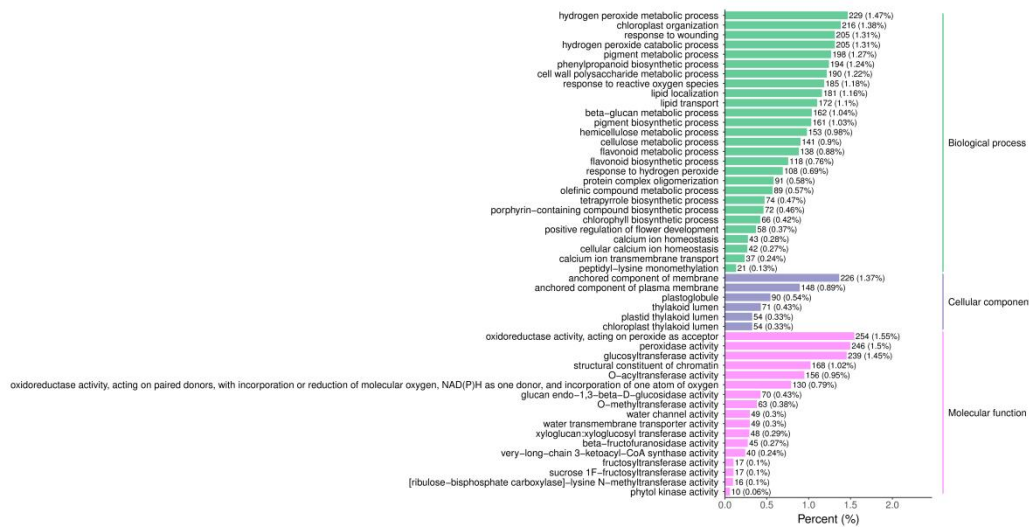


图 4-7 BR vs. S 对比组差异基因 GO 富集分析

Fig. 4-7 GO enrichment analysis of differential genes in the BR vs. S comparison group

对 Cvs. S 对比组中差异表达基因进行 GO 富集分析，结果如图 4-8。在生物过程分类中富集最为显著的功能是过氧化氢代谢过程、对伤口的反应色素代谢过程、过氧化氢分解代谢过程、多糖分解代谢过程、细胞壁多糖代谢过程、苯丙酮生物合成过程对活性氧的反应、色素生物合成过程 β -葡聚糖代谢过程；在细胞组分过程中，膜锚定成分、蛋白质-DNA 复合物、核小体以及质粒是富集最为显著的功能；而在分子功能方面，富集最为显著的功能是以过氧化物为受体的氧化还原酶活性、过氧化物酶活性、葡萄糖基转移酶活性、被动跨膜转运体活性、通道活性、染色质的结构成分以及木聚糖酶活性等功能。

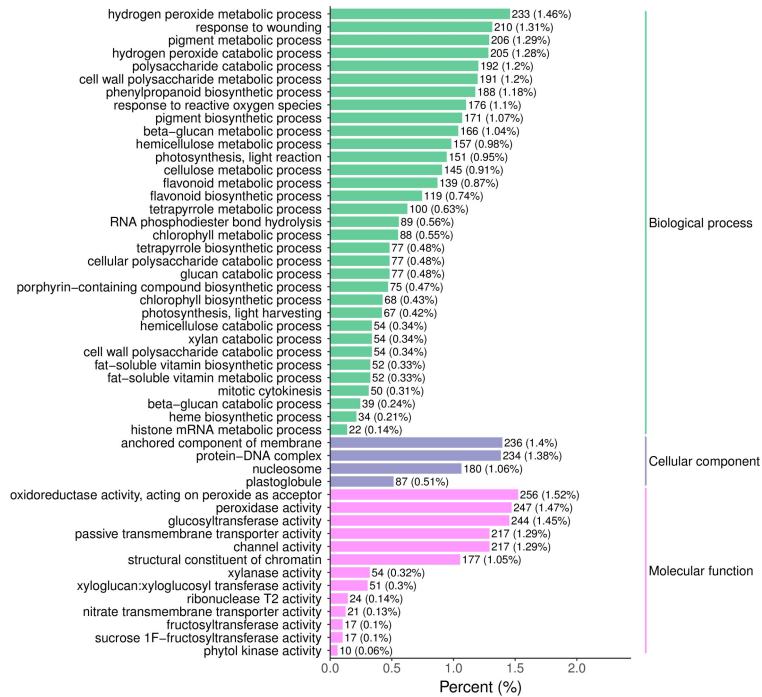


图 4-8 C vs. S 对比组差异基因 GO 富集分析

Fig. 4-8 GO enrichment analysis of differential genes in the C vs. S comparison group

4.4.8 差异基因的 KEGG 分析

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 是一个综合性数据库，其整合了基因组、生物学通路、疾病、药物、化学物质等各种信息。KEGG 提供了广泛的基因和蛋白质相关信息，以及它们在生物学通路中的相互作用。运用 KEGG 富集分析，能帮助我们有效的进一步解读差异基因的功能。在对 BR vs. C 对比组中差异表达基因进行 KEGG 富集分析后，我们发现它们显著富集到 9 个代谢通路当中，包括光合作用-天线蛋白、核糖体、内质网中的蛋白质加工、光合作用、乙醛酸和二羧酸代谢、昼夜节律、植物柠檬酸循环（TCA 循环）、碳代谢以及光合生物的碳固定，其中在核糖体中显著富集的基因数量最多(图 4-9)。

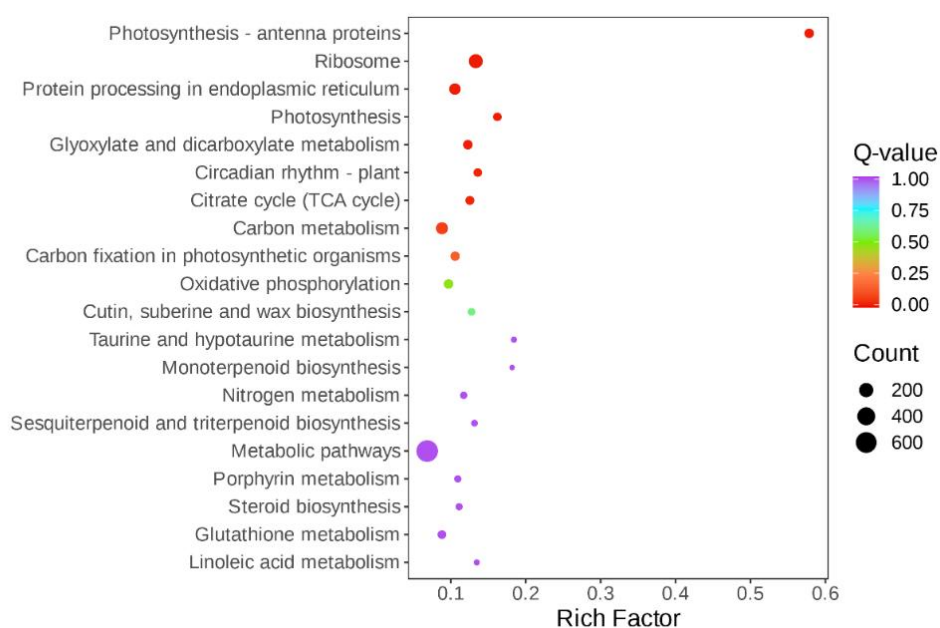


图 4-9 BR vs. C 对比组差异基因 KEGG 富集分析

Fig. 4-9 KEGG enrichment analysis of differential genes in the BR vs. C comparison group

在 BR vs. S 对比组的 KEGG 富集分析中, 差异表达基因显著富集到 11 个代谢通路当中。包括次级代谢物的生物合成、苯丙酮的生物合成、代谢途径、黄酮类化合物的生物合成、淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导、半乳糖代谢、芪类、二庚烷类和姜酚的生物合成、脂肪酸链的伸长、木质素、亚木质素和蜡的生物合成、类胡萝卜素的生物合成、磷酸戊糖途径, 其中富集基因数量最多的是代谢途径以及次级代谢物的生物合成途径。

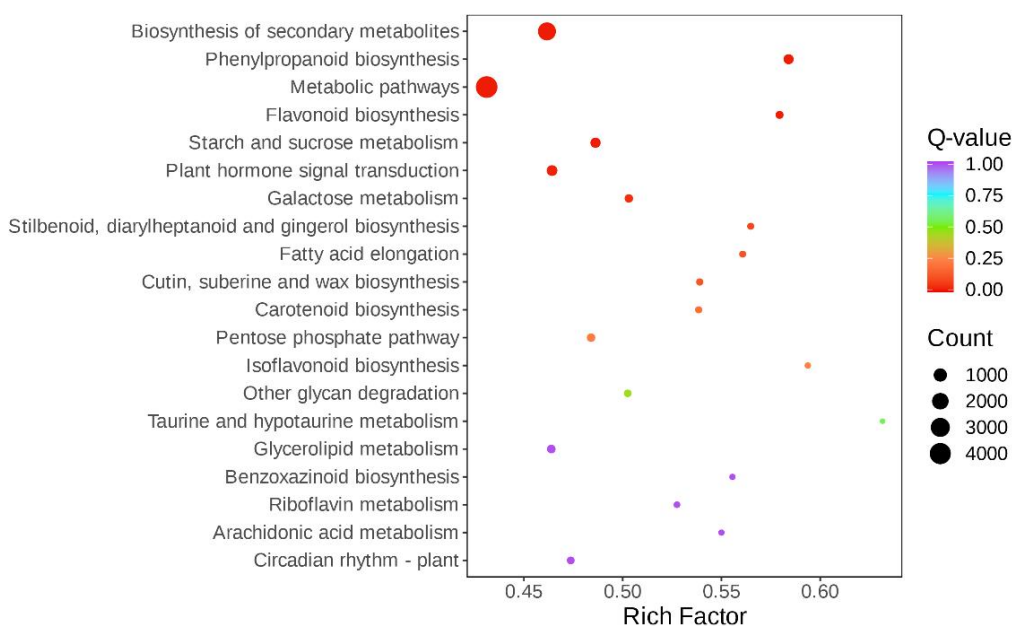


图 4-10 BR vs. S 对比组差异基因 KEGG 富集分析

Fig. 4-10 KEGG enrichment analysis of differential genes in BR vs. S comparison group

在 C vs. S 对比组的 KEGG 富集分析中，差异基因主要富集 8 个代谢通路当中，包括次级代谢物的生物合成、苯丙氨酸的生物合成、代谢途径、淀粉和蔗糖代谢、木质素、单宁和蜡的生物合成、类胡萝卜素的生物合成、植物的昼夜节律、半乳糖代谢，其中以代谢途径和次级代谢物的生物合成中富集的基因最多。

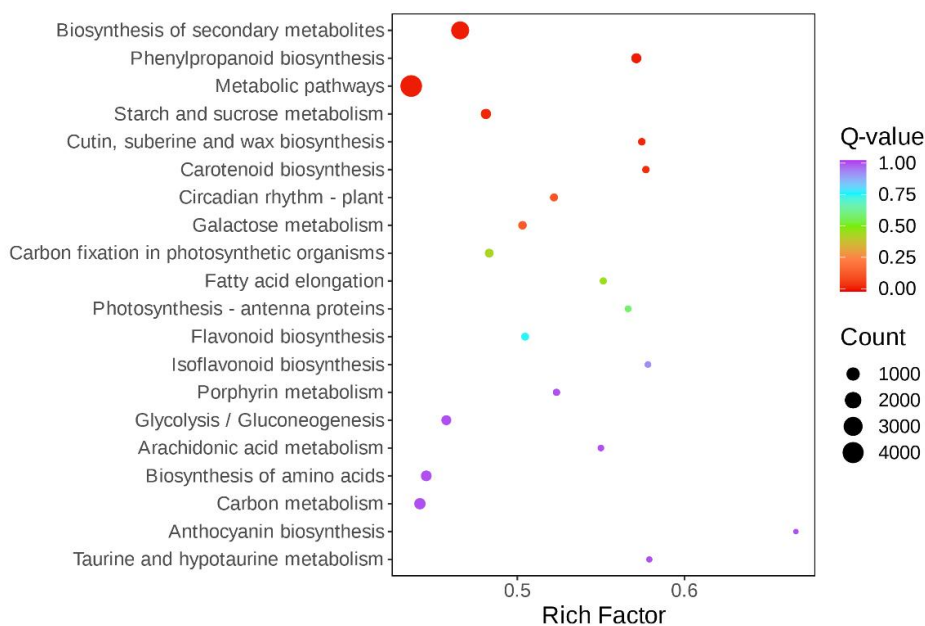


图 4-11 C vs. S 对比组差异基因 KEGG 富集分析

Fig 4-11 KEGG enrichment analysis of differential genes in the C vs. S comparison group

总体上来说,三个对比组的 KEGG 富集分析有相似也有不同, BR vs. S 与 C vs. S 中, 都有最多的差异基因富集到代谢途径和次级代谢物的生物合成两个途径当中, 这表明了青稞萌发会改变一些代谢物的生成, 并且是通过改变代谢通路里与代谢物有关基因的表达水平来实现的。而与 C vs. S 不同的是, 在 BR vs. S 组中, 差异表达基因在植物激素信号转导通路中显著富集, 这表明油菜素内酯处理对青稞籽粒发挥了一定的调控效果, 改变了青稞中一些与植物信号转导有关的基因的表达水平。

4.4.9 与褪黑素合成相关的差异基因

以 $|\log_2\text{FoldChange}| \leq 1$, $P\text{-value} < 0.05$ 作为标准筛选三个比较组 (BR vs. C、BR vs. S 和 C vs. S) 中与褪黑素代谢有关的显著性差异表达基因, 结果如表 4-4 所示。在 BR vs. C 中, 检测到一个与褪黑素合成有关的差异显著基因; 而在 BR vs. S 中, 共检测到 22 个与褪黑素生物合成有关的差异显著基因; 在 C vs. S 中, 也检测到 22 与褪黑素生物合成有关的差异显著基因。

表 4-4 三个比较组中与褪黑素有关的差异基因

Table 4-4 Differential Genes Associated with Melatonin in the Three Comparison Groups

	ID	log2FoldChange	P-value	regulated	Description
BR vs. C	Cluster-33739.0	1.419261192	0.000180035	up	O-methyltransferase ZRP4
	Cluster-38931.1	8.647767693	2.8271E-209	up	S-norcoclaurine synthase 1
	Cluster-44523.0	3.975271	4.5E-144	up	serotonin N-acetyltransferase 1, chloroplastic
	Cluster-33296.1	-3.15454	1.2E-126	down	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 19-like isoform X1
BR vs. S	Cluster-21726.10	2.68901	2.4E-103	up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 33 isoform X2
	Cluster-21726.1	-4.9412	1.13E-73	down	putative iron/ascorbate-dependent oxidoreductase
	Cluster-29775.0	10.63865	1.5E-72	up	acetylserotonin O-methyltransferase 1-like
	Cluster-37595.0	9.543566	2.16E-58	up	acetylserotonin O-methyltransferase 1-like
	Cluster-30241.0	9.12567	5.96E-45	up	Protein SRG1

	ID	log2FoldChange	P-value	regulated	Description
	Cluster-32579.0	2.813093	1.92E-40	up	O-methyltransferase 1, chloroplastic isoform X1
	Cluster-26560.0	-1.46249	2.78E-34	down	predicted protein, partial
	Cluster-16692.0	-5.05605	1.18E-20	down	hypothetical protein ZWY2020_051464
	Cluster-35330.0	10.53456	5.18E-19	up	O-methyltransferase ZRP4
	Cluster-23453.0	-1.00974	1.71E-14	down	protein CANDIDATE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR 2-like
	Cluster-34674.3	1.415291	6.76E-12	up	hypothetical protein ZWY2020_040036
	Cluster-18497.0	7.991678	4.62E-11	up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 11-like
	Cluster-33739.0	8.141308	5.72E-11	up	O-methyltransferase ZRP4
	Cluster-40872.5	2.355539	4.2E-09	up	predicted protein, partial
	Cluster-41003.9	-4.02095	1.04E-08	down	2-oxoglutarate-Fe(II) type oxidoreductase hxnY isoform X3
	Cluster-19646.0	-2.38141	2.35E-08	down	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 21, chloroplastic-like
	Cluster-21726.8	1.037991	4.54E-06	up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 33 isoform X2
	Cluster-21726.6	1.586378	0.023708	up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 33-like isoform X1
	Cluster-17573.1	2.250199	0.031438	up	hypothetical protein ZWY2020_051083
C vs.S	Cluster-38931.1	9.174223	1.15E-243	up	S-norcochlorogenic acid synthase 1
	Cluster-44523.0	4.1431	1.33E-161	up	serotonin N-acetyltransferase 1, chloroplastic
	Cluster-21726.10	2.716647	4.63E-122	up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 33 isoform X2
	Cluster-33296.1	-2.63338	6.11E-102	down	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 19-like isoform X1
	Cluster-29775.0	10.96383	6.407E-77	up	acetylserotonin O-methyltransferase 1-like

ID	log2FoldChange	P-value	regulated	Description
Cluster-21726.1	-4.50754	2.437E-72	down	putative iron/ascorbate-dependent oxidoreductase
Cluster-37595.0	9.221929	4.055E-52	up	acetylserotonin O-methyltransferase 1-like
Cluster-30241.0	9.496486	1.675E-48	up	Protein SRG1
Cluster-32579.0	2.69754	1.28E-37	up	O-methyltransferase 1, chloroplastic isoform X1
Cluster-26560.0	-1.36769	1.063E-28	down	predicted protein, partial
Cluster-23453.0	-1.3492	7.204E-27	down	protein CANDIDATE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR 2-like
Cluster-34674.3	1.895015	3.857E-26	up	hypothetical protein ZWY2020_040036
Cluster-35330.0	10.19453	1.014E-17	up	O-methyltransferase ZRP4
Cluster-21726.8	1.71223	6.501E-15	up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 33 isoform X2
Cluster-16692.0	-4.26353	2.079E-13	down	hypothetical protein ZWY2020_051464
Cluster-18497.0	7.61689	6.872E-10	up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 11-like
Cluster-19646.0	-2.62167	1.739E-08	down	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 21, chloroplastic-like
Cluster-17573.6	3.267677	7.563E-05	up	predicted protein
Cluster-40872.5	1.834714	0.0003536	up	predicted protein, partial
Cluster-41003.9	-2.59054	0.0020681	down	2-oxoglutarate-Fe(II) type oxidoreductase hxnY isoform X3
Cluster-21726.11	1.127556	0.00463	up	hypothetical protein ZWY2020_053109
Cluster-21726.6	1.808069	0.0092454	up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 33-like isoform X1

植物中褪黑素合成的前体物质为色氨酸,褪黑素的生物合成途径是包含色氨酸的代谢途径中的,色氨酸代谢通路途径如下图 4-12。在 BR vs. C 的比较组中,检测到一个与褪黑素代谢有关的显著性差异基因 Cluster-33739.0,对这个基因进

行KEGG 功能注释结果发现,该基因为调控乙酰血清素 O-甲基转移酶(EC:2.1.1.4)的一个基因,且相较于 C 在 BR 组中高表达。这表明,100 μ mol 的外源油菜素内酯处理通过显著提升 Cluster-33739.0 基因的表达水平,来提升乙酰血清素 O-甲基转移酶(ASMT, EC:2.1.1.4)的活性,从而实现在青稞幼苗中富集褪黑素的效果。

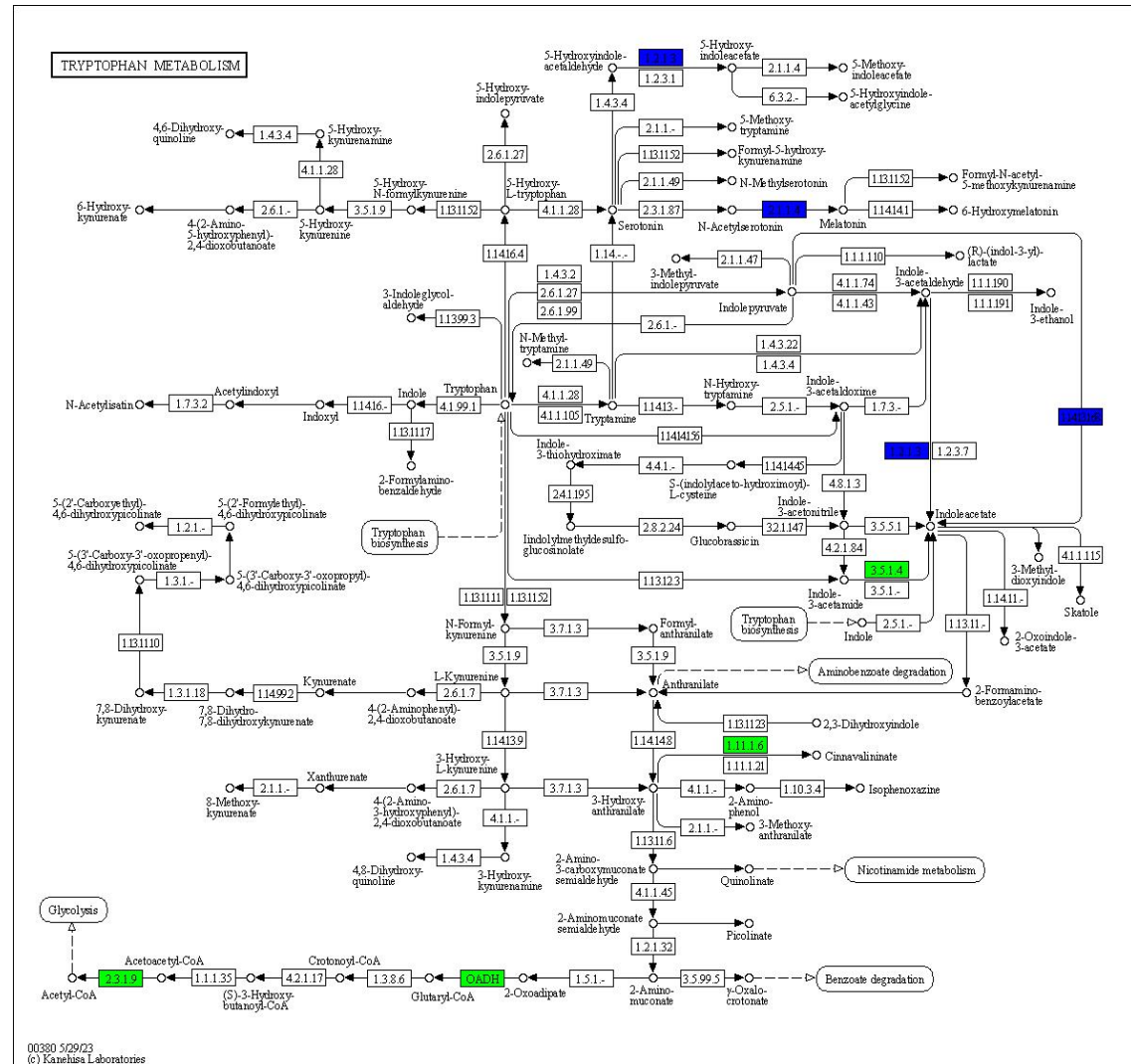


图 4-12 BR vs. C 中色氨酸代谢通路图

Fig. 4-12 Diagram of tryptophan metabolic pathways in BR vs. C

而在 C 与 S 的对比组中对于褪黑素有关的差异基因进行注释发现(图 4-13), 在无菌水作用处理之后, 在青稞籽粒中吲哚丙酮酸代谢到色氨酸途径中, Cluster-26390.0 调控的芳香氨基酸转氨酶(K00837, EC:2.6.1.-)的表达被激活高表达, 而色氨酸代谢生成到吲哚丙酮酸的, 受 Cluster-39303.0 以及 Cluster-23763.0 两个基因调控的 L-色氨酸—丙酮酸氨基转移酶(K16903, EC:2.6.1.99)的活性

则受到抑制，表达水平下降。这说明了萌发的作用下，褪黑素的前体物质色氨酸受到酶的影响开始在 C 组中大量积累，并未后续转化生成褪黑素提供物质基础。然后，我们发现在从色氨酸经过 5-羟基色氨酸到血清素再到 N-乙酰血清素最后到褪黑素这条代谢途径中，受 Cluster-41233.0、Cluster-41233.1、Cluster-38891.5、Cluster-35815.2、Cluster-35815.1、Cluster-31496.0、Cluster-17964.0 七个差异表达基因调控的 L-色氨酸脱羧酶（K01593（TDC），EC:4.1.1.28）、Cluster-44523.0、Cluster-34674.3、Cluster-34893.0 三个差异显著基因调控的芳基烷基胺 N-乙酰转移酶（K22450，EC:2.3.1.87）以及 Cluster-37595.0 调控的乙酰羟色胺 O-甲基转移酶（K22588，（ASMT），EC:2.1.1.4）全部被激活且在 C 组中高表达，这加快了色氨酸代谢生成褪黑素的作用。以上说明了萌发对青稞籽粒中褪黑素富集效果是通过调控色氨酸代谢到褪黑素途径中一系列酶的活性来实现的。而在 BR 与 S 的对比组中也看到了类似的效果（图 4-14），这表明了萌发处理对青稞中褪黑素的富集具有一定的效果，很好的解释了第二章中相较于种子，萌发后第三天的青稞中褪黑素含量上升的分子机制。

Fig. 4-13 Diagram of tryptophan metabolic pathways in C vs.S

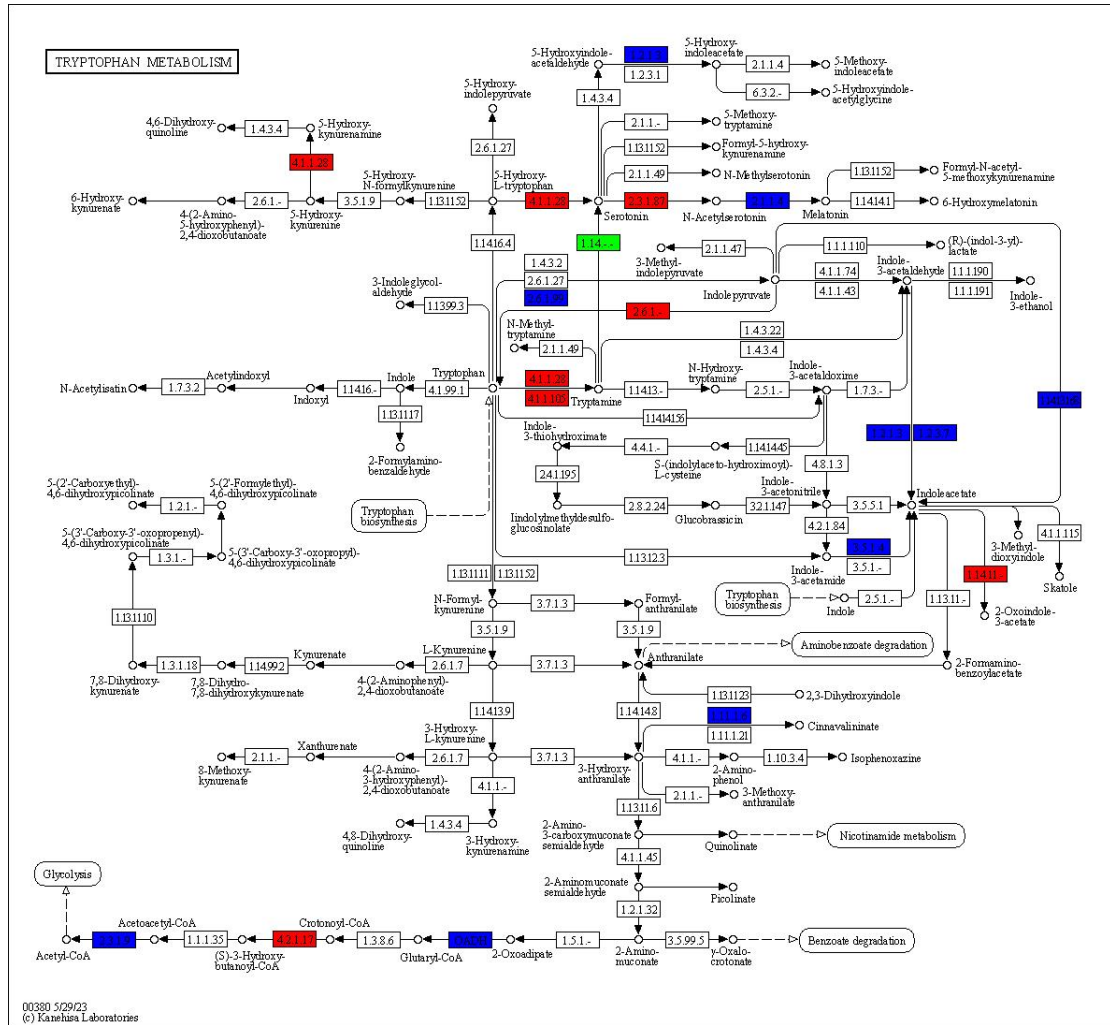


图 4-14 BR vs. S 中色氨酸代谢通路图

Fig. 4-14 Diagram of tryptophan metabolic pathways in BR vs.S

4.5 本章小结

本章通过转录组测序分析了三组样本 BR（100 μmol 油菜素内酯处理发芽第三天青稞幼苗）、C（无菌水处理发芽第三天青稞幼苗）以及 S（无菌水处理不发芽第 0 天的青稞种子）的差异表达基因，并讨论了在代谢基因的富集情况以及与褪黑素有关的差异表达基因，主要结论如下：

1. 将三组通过转录组数据进行对比分析后，发现三组中共有差异表达基因 1443 个，BR 与 C 组差异表达基因共有 3675 个，其中上调基因 1014 个，下调基因 2661 个；BR 与 S 组差异表达基因共有 26001 个，其中上调基因 14401 个，下调基因 11600 个；C 与 S 组差异表达基因 26753，其中上调基因 15438 个，下调基因 11315 个

2. 对三组进行 GO 与 KEGG 富集分析, 结果显示, 三组在差异基因的富集上有所不同。BR 与 C 组主要富集在光合作用, 光收集、有机化合物氧化的能量衍生、细胞呼吸、光合作用, 采光、节律过程、有氧呼吸 (GO), 光合作用-天线蛋白、核糖体、内质网中的蛋白质加工、光合作用、乙醛酸和二羧酸代谢、昼夜节律、植物柠檬酸循环 (TCA 循环)、碳代谢以及光合生物的碳固定 (KEGG); BR 与 S 组差异基因主要富集到过氧化氢代谢过程、叶绿体组织对伤口的反应、过氧化氢分解代谢过程、色素代谢过程、苯丙氨酸生物合成过程等 (GO), 次级代谢物的生物合成、苯丙酮的生物合成、代谢途径、黄酮类化合物的生物合成等 (KEGG); C 与 S 组差异基因主要富集过氧化氢代谢过程、对伤口的反应色素代谢过程、过氧化氢分解代谢过程、多糖分解代谢过程等 (GO), 次级代谢物的生物合成、苯丙氨酸的生物合成、代谢途径、淀粉和蔗糖代谢、木质素、单宁和蜡的生物合成 (KEGG)。

3. 对三组进行与褪黑素生物合成有关的差异基因进行分析, 发现在 BR vs. C 中, 检测到一个与褪黑素生物合成有关的差异显著基因; 而在 BR vs. S 中, 共检测到 22 个与褪黑素代谢有关的差异显著基因; 在 C vs. S 中, 也检测到 22 与褪黑素代谢有关的差异显著基因。其中, 萌发能够通过上调 L-色氨酸脱羧酶、芳基烷基胺 N-乙酰转移酶以及乙酰羟色胺 O-甲基转移酶的活性来促进青稞种子中褪黑素含量的积累, 而外源油菜素内酯能够通过上调乙酰血清素 O-甲基转移酶的活性来促进血清素向褪黑素的代谢, 来实现青稞幼苗中褪黑素的富集。

第5章 结论与展望

5.1 结论

(1) 油菜素内酯、赤霉素以及乙烯在不同的浓度下对青稞幼苗的生长情况的影响是不同的 50 μmol 以及 100 μmol 的浓度下能够明显促进青稞幼苗胚根以及胚芽的生长, 而在 200 μmol 浓度下则会表现出对青稞幼苗生长的抑制作用; 乙烯表现出的作用与油菜素内酯相似, 都表现为低浓度下 (50 μmol 与 100 μmol) 下外源处理能够促进青稞幼苗的生长, 促进胚根及胚芽的发育; 而赤霉素不同于油菜素内酯与褪黑素, 只在 50 μmol 的浓度下表现出对青稞幼苗生长的促进作用, 100 μmol 及 200 μmol 下则会表现出抑制作用。此外, 三种植物激素的处理下, 油菜素内酯对于青稞幼苗中褪黑素富集效果最好, 在第三天时达到最大, 为 $19.42 \pm 0.33 \text{ ng/g}$, 是对照组 (CK, $14.42 \pm 0.18 \text{ ng/g}$) 的 1.34 倍、是种子 ($11.46 \pm 0.15 \text{ ng/g}$) 的 1.69 倍。而乙烯和赤霉素分别在 50 μmol 浓度处理下的发芽第一天青稞籽粒中褪黑素在各组中表现最大, 为 $16.09 \pm 0.25 \text{ ng/g}$, 是同期对照组 ($15.27 \pm 0.22 \text{ ng/g}$) 的 1.05 倍以及在 50 μmol 处理 ($13.26 \pm 0.25 \text{ ng/g}$) 下第 0 天时相较对照组 ($11.70 \pm 0.28 \text{ ng/g}$) 有着明显的诱导作用, 是对照组的 1.15 倍左右, 后两者诱导青稞幼苗中褪黑素富集的效果远不如油菜素内酯。

(2) 研究了在不同油菜素内酯溶液 0 μmol 、50 μmol 、100 μmol 以及 200 μmol 的浓度下, 对青稞幼苗中功能物质及生理代谢的影响, 结果表明: 外源油菜素内酯处理对青稞中 β -葡聚糖、 γ -氨基丁酸、总酚、总黄酮、总淀粉以及丙二醛都产生了一定的影响。外源油菜素内酯在 100 μmol 浓度下能够促进青稞幼苗在第一天积累 β -葡聚糖含量达到最大, 为 $13.07 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$, 相较对照组提高 1.88 $\mu\text{g/g}$ 左右; 对萌发青稞幼苗中 GABA 含量积累也具有一定的促进作用, 在 200 μmol 浓度下青稞萌发第 5 天时含量最大, 为 $16.80 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$, 相较对照提升了 2.34 $\mu\text{g/g}$; 外源油菜素内酯处理对于萌发青稞幼苗中总酚总黄酮的积累也具有一定的促进作用, 分别在 100 μmol 浓度处理下第六天总黄酮含量达到最大, 为 $8.33 \pm 0.18 \text{ mg/g}$, 是无菌水处理组 ($4.68 \pm 0.24 \text{ mg/g}$, CK) 的 1.78 倍以及在 50 μmol 的浓度处理下, 在第五天时积累总酚的含量达最大为 $2.88 \pm 0.10 \text{ mg/g}$, 相较对照

组提升 0.31 mg/g 左右；同时，油菜素内酯的处理对萌发青稞中直链淀粉与支链淀粉的含量具有一定的作用，表现为在 200 μmol 对青稞中阻止其幼苗当中直链淀粉与支链淀粉的分解作用；此外，外源油菜素内酯能够表现出对青稞籽粒在萌发过程产生丙二醛的抑制作用，能够一定程度上缓解青稞在萌发过程中的脂质氧化。

(3) 通过转录组测序分析了三组样本 BR (100 μmol 油菜素内酯处理发芽第三天青稞幼苗)、C (无菌水处理发芽第三天青稞幼苗) 以及 S (无菌水处理不发芽第 0 天的青稞种子) 的差异表达基因，发现三组中 BR 与 C 组差异表达基因共有 3675 个、BR 与 S 组差异表达基因共有 26001 个、C 与 S 组差异表达基因 26753 个。富集分析的结果显示，BR 与 C 组主要富集在光合作用，光收集、有机化合物氧化的能量衍生、细胞呼吸等过程，BR 与 S 组差异基因主要富集次级代谢物的生物合成、苯丙酮的生物合成、代谢途径、黄酮类化合物的生物合成等过程，C 与 S 组差异基因主要富集到次级代谢物的生物合成、苯丙氨酸的生物合成、代谢途径、淀粉和蔗糖代谢等过程。萌发能够通过上调 L-色氨酸脱羧酶、芳基烷基胺 N-乙酰转移酶以及乙酰羟色胺 O-甲基转移酶的活性来促进青稞种子中褪黑素含量的积累，而外源油菜素内酯能够通过上调乙酰血清素 O-甲基转移酶的活性来促进血清素向褪黑素的代谢，来实现青稞幼苗中褪黑素的富集效果。

5.2 创新

(1) 以青稞作为研究材料，研究外源油菜素内酯对其生理代谢的影响，是本课题的一大创新点。

(2) 研究了在外源性油菜素内酯的作用下，青稞中内源性褪黑素含量的变化并初步通过组学方法揭示其调控机制，是本课题又一大创新点。

5.3 展望

(1) 本课题只探究了三种植物激素（油菜素内酯、赤霉素以及乙烯）对萌发青稞中褪黑素含量的影响，并未探究其他植物激素如茉莉酸甲酯、水杨酸以及独脚金内酯等新型植物激素对青稞中内源性褪黑素含量的影响。

(2) 本研究目前只是揭示了油菜素内酯处理能够引起青稞内源性褪黑素的变化，这种变化是通过影响有关基因的表达进而影响酶的活性来实现的，而具体是怎样来实现这种影响的，比如是否是通过响应油菜素内酯的相关基因可作为褪黑素合

成酶调控基因的启动子来实现的。需要进一步结合有关技术如单细胞酵母杂交等技术进行验证。

参考文献

- [1] Gong L X, Jin C , Wu L J ,et al.Tibetan hull-less barley (*Hordeum vulgare* L.) as a potential source of antioxidants[J].*Cereal Chemistry*, 2012(6):89.
- [2] 邓婧,马小涵,赵天天等.青稞 β -葡聚糖对淀粉体外消化性的影响[J].*食品科学*,2018,39(10):106-111.
- [3] Ruirong P, Hassane Hamadou A, Xu B. Germination in improving the nutrition, health benefits and processing of highland barley[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2024,4(59):2162-2171.
- [4] 张峰,杨勇,赵国华等.青稞 β -葡聚糖研究进展[J].*粮食与油脂*,2003,(12):3-5.
- [5] Zhu Y, Fu N, Li D, et al. Physical and viscoelastic properties of different moisture content highland barley kernels[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2017, 13(12): 20170186.
- [6] 乔丙颖,胥婷婷,张洋等.不同有机肥替代比例对青稞产量、养分利用和土壤性质的影响[J].*农业资源与环境学报* 2024:1-15[2024-03-17].
- [7] Obadi M, Sun J, Xu B. Highland barley: Chemical composition, bioactive compounds, health effects, and applications[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 110065.
- [8] Hong Q, Chen G, Wang Z, et al. Effects of different thermal processing methods on bioactive components, phenolic compounds, and antioxidant activities of Qingke (highland hull-less barley)[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2023, 12(1): 119-129.
- [9] 阚建全,洪晴悦.青稞生物活性成分及其生理功能研究进展[J].*食品科学技术学报*,2020,38(06):11-20.
- [10] Bhatta R S. The potential of hull-less barley[J]. *Cereal Chemistry*, 1999, 76(5): 589-599.
- [11] Zeng X, Guo Y, Xu Q et al. Origin and evolution of qingke barley in Tibet[J]. *Nature Communication*. 2018,21;9(1):5433.
- [12] Yang X J, Dang B, Fan M T. Free and bound phenolic compound content and antioxidant activity of different cultivated blue highland barley varieties from the

- Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 879.
- [13]陈秋和,张林,苗娅莉等.褪黑素与妇科恶性肿瘤关系的研究进展[J].实用妇产科杂志,2024,40(02):126-129.
- [14] Emet M, Ozcan H, Ozel L et al. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs[J]. *The Eurasian journal of medicine*,2016,2(48):135-41.
- [15] Carocci A, Catalano A, Sinicropi M S. Melatonergic drugs in development[J]. *Clinical pharmacology: advances and applications*, 2014: 127-137.
- [16] Zhang N, Sun Q, Zhang H et al. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants[J]. *Journal of experimental botany*, 2015,66 (3):647-56.
- [17] Arnao M, Hernández-Ruiz J. Melatonin in flowering, fruit set and fruit ripening[J]. *Plant Reproduction*, 2020,2(33):77-87.
- [18]周宏丹,罗晓萍,涂米雪等.植物褪黑素: 植物应答非生物胁迫的新兴信号分子[J/OL].生物技术通报:1-11[2024-03-18].
- [19] Liu G, Hu Q, Zhang X, Jiang J et al. Melatonin biosynthesis and signal transduction in plants in response to environmental conditions[J]. *Journal of experimental botany*, 2022,17(73):5818-5827.
- [20] Back K, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts[J]. *Journal of Pineal Research*,2016,4(61), 426-437.
- [21] Zhang Z, Zhang Y. Melatonin in plants: what we know and what we don't[J]. *Food Quality and Safety*,2021,5:1-9.
- [22] Moustafa-Farag M, Almoneafy A, Mahmoud A, et al. Melatonin and its protective role against biotic stress impacts on plants[J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1): 54.
- [23] Arnao M B, Hernández-Ruiz J. Melatonin and its relationship to plant hormones[J]. *Annals of Botany*, 2018, 121(2): 195-207.
- [24] Arnao M B, Hernández-Ruiz J. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator? [J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(1): 38-48.
- [25] Wei W, Tao J J, Yin C C, et al. Melatonin regulates gene expressions through

- activating auxin synthesis and signaling pathways[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1057993.
- [26] Wang Y, Li J, Yang L, Chan Z. Melatonin Antagonizes Cytokinin Responses to Stimulate Root Growth in Arabidopsis[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022, 42, 1833-1845.
- [27] Lv Y, Pan J, Wang H, et al. Melatonin inhibits seed germination by crosstalk with abscisic acid, gibberellin, and auxin in Arabidopsis[J]. *Journal of pineal research*, 2021, 70(4): e12736.
- [28] Li X, Tan D X, Jiang D, et al. Melatonin enhances cold tolerance in drought-primed wild-type and abscisic acid-deficient mutant barley[J]. *Journal of Pineal Research*, 2016.
- [29] Luo M, Wang D, Delaplace P, et al. Melatonin enhances drought tolerance by affecting jasmonic acid and lignin biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 2023, 202: 107974.
- [30] 袁瑞敏, 彭静, 王佳傲等. 褪黑素调控水杨酸和乙烯代谢维持沙果贮藏品质[J]. *核农学报*, 2023, 37(09): 1798-1805.
- [31] Yang L, Sun Q, Wang Y, et al. Global transcriptomic network of melatonin regulated root growth in Arabidopsis[J]. *Gene*, 2021, 764: 145082.
- [32] Chen W, Zhang J, Zheng S, et al. Metabolite profiling and transcriptome analyses reveal novel regulatory mechanisms of melatonin biosynthesis in hickory[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8: 196.
- [33] Zhou Q, Bao Z, Yu Y, et al. IAA regulated levels of endogenous phytohormones in relation to chilling tolerance in cold-stored peaches after harvest[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 205: 112490.
- [34] Hwang O J, Back K. Exogenous gibberellin treatment enhances melatonin synthesis for melatonin-enriched rice production[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 198.
- [35] Yin Y, Wang C, Cheng C, et al. Exogenous methyl jasmonate promotes the biosynthesis of endogenous melatonin in mustard sprouts[J]. *Plant Physiology*

- and Biochemistry, 2023, 203: 108055.
- [36]王小璐. 24-表油菜素内酯对猕猴桃果实冷藏品质的影响及其机理[D].西北大学,2021.
- [36]郑婷,程建徽,魏灵珠等.油菜素内酯及其在园艺植物中的研究进展[J/OL].分子植物育种,1-9.
- [37]兰雪,王玮,张少英.油菜素内酯对植物根发育调控机制研究进展[J].分子植物育种,2020,18(04):1162-1169.
- [38] Bajguz A. Metabolism of brassinosteroids in plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(2): 95-107.
- [39]范翠枝,吴馨怡,关欣等.油菜素内酯浸种对盐胁迫番茄种子萌发的影响及其生理机制[J].生态学报,2021,41(05):1857-1867.
- [40] Ohnishi T. Recent advances in brassinosteroid biosynthetic pathway: insight into novel brassinosteroid shortcut pathway[J]. Journal of Pesticide Science, 2018, 43(3): 159-167.
- [41] Small C C, Degenhardt D, McDonald T. Plant growth regulators for enhancing Alberta native grass and forb seed germination[J]. Ecological Engineering, 2019, 142: 100003.
- [42] de Jesus T F, Rodrigues A A, do Santos L S, et al. Physiological performance of brassinolide-conditioned green soybean seeds[J]. South African Journal of Botany, 2024, 165: 237-245.
- [43] Zhao X, Dou L, Gong Z, et al. BES1 hinders ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and promotes seed germination in Arabidopsis[J]. The New Phytologist, 2019(2):221.
- [44] Zhu T, Tan W R, Deng X G, et al. Effects of brassinosteroids on quality attributes and ethylene synthesis in postharvest tomato fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2015, 100: 196-204.
- [45] Zhang L, Song C, Guo D, et al. Identification of differentially expressed miRNAs and their target genes in response to brassinolide treatment on flowering of tree peony (*Paeonia ostii*)[J]. Plant Signaling & Behavior, 2022,

- 17(1): 2056364.
- [46] Efimova M V, Litvinovskaya R P, Medvedeva Y V, et al. The endogenous brassinosteroid content and balance in potato microclones is determined by organ specificity and the variety ripening term[C]//Doklady Biological Sciences. Pleiades Publishing, 2019, 485: 33-36.
- [47] Leubner-Metzger G. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways[J]. *Planta*, 2001, 213: 758-763.
- [48] Kaya C, Ashraf M, Alyemeni M N, et al. The role of nitrate reductase in brassinosteroid-induced endogenous nitric oxide generation to improve cadmium stress tolerance of pepper plants by upregulating the ascorbate-glutathione cycle[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2020, 196: 110483.
- [49] Li T, Xu X, Li Y, et al. Comparative transcriptome analysis reveals differential transcription in heat-susceptible and heat-tolerant pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars under heat stress[J]. *Journal of plant biology*, 2015, 58: 411-424.
- [50] Chaudhary P, Xu M, Ahamad L, et al. Application of synthetic consortia for improvement of soil fertility, pollution remediation, and agricultural productivity: a review[J]. *Agronomy*, 2023, 13(3): 643.
- [51] Chi C, Li X, Fang P, et al. Brassinosteroids act as a positive regulator of NBR1-dependent selective autophagy in response to chilling stress in tomato[J]. *Journal of experimental botany*, 2020, 71(3): 1092-1106.
- [52] Li B, Zhang C, Cao B, et al. Brassinolide enhances cold stress tolerance of fruit by regulating plasma membrane proteins and lipids[J]. *Amino Acids*, 2012, 43: 2469-2480.
- [53] Hwang O J, Back K. Melatonin is involved in skotomorphogenesis by regulating brassinosteroid biosynthesis in rice plants[J]. *Journal of pineal research*, 2018, 65(2): e12495.
- [54] Fu J, Zhang S, Jiang H, et al. Melatonin-induced cold and drought tolerance is regulated by brassinosteroids and hydrogen peroxide signaling in perennial ryegrass[J]. *Environmental and experimental botany*, 2022(196-).

-
- [55] Li Y, Dong Q, Wu D, et al. A 24-epibrassinolide treatment and intercrop** willow with alfalfa increase the efficiency of the phytoremediation of cadmium-contaminated soil[J]. *Science of The Total Environment*, 2023, 854: 158471.
- [56] 林海燕,曾超珍,谭斌等.转录组学技术在茶树抗逆性的研究进展[J].*分子植物育种*,2019,17(03):803-810.
- [57] El Mujtar V, Lopez M, Amalfi S, et al. Characterisation and transferability of transcriptomic microsatellite markers for *Nothofagus* species[J]. *New Zealand journal of botany*, 2017, 55(3): 347-356.
- [58] Kahlau S, Bock R. Plastid Transcriptomics and Translatomics of Tomato Fruit Development and Chloroplast-to-Chromoplast Differentiation: Chromoplast Gene Expression Largely Serves the Production of a Single Protein[J]. *THE PLANT CELL ONLINE*, 2008, 20(4):856-874.
- [59] Slocombe S P, Schauvinhold I, McQuinn R P, et al. Transcriptomic and reverse genetic analyses of branched-chain fatty acid and acyl sugar production in *Solanum pennellii* and *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant physiology*, 2008, 148(4): 1830-1846.
- [60] Evers D, Legay S, Lamoureux D, et al. Towards a synthetic view of potato cold and salt stress response by transcriptomic and proteomic analyses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78: 503-514.
- [61] 张成,周承哲,田采云等.空间转录组学技术及其在植物研究中的应用[J/OL].*生物工程学报*:1-17[2024-03-23].
- [62] Shi H, Wang X, Tan D X, et al. Comparative physiological and proteomic analyses reveal the actions of melatonin in the reduction of oxidative stress in Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.) [J]. *Journal of Pineal Research*, 2015, 59(1): 120-131.
- [63] Di H, Zhang C, Zhou A, et al. Transcriptome Analysis Reveals the Mechanism by Which Exogenous Melatonin Treatment Delays Leaf Senescence of Postharvest Chinese Kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) [J]. *International Journal of*

- Molecular Sciences, 2024, 25(4): 2250.
- [64] Wang J, Yan D, Lu Z, et al. Integration of the Metabolome and Transcriptome Reveals Diurnal Variability in the Effects of Melatonin on Salt Tolerance in Maize Seedlings[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2024: 1-17.
- [65] Yang X, Liu D, Liu C, et al. Possible melatonin-induced salt stress tolerance pathway in *Phaseolus vulgaris* L. using transcriptomic and metabolomic analyses[J]. BMC Plant Biology, 2024, 24(1): 72.
- [66] Pham T H, Tian X, Zhao H, et al. Genome-wide characterization of COMT family and regulatory role of CsCOMT19 in melatonin synthesis in *Camellia sinensis*[J]. BMC Plant Biology, 2024, 24(1): 51.
- [67] Seed Dormancy, Germination and Pre-Harvest Sprouting[M]. Frontiers Media SA, 2019.
- [68] Carrera-Castaño G, Calleja-Cabrera J, Pernas M, et al. An updated overview on the regulation of seed germination[J]. Plants, 2020, 9(6): 703.
- [69] Miransari M, Smith D L. Plant hormones and seed germination[J]. Environmental and experimental botany, 2014, 99: 110-121.
- [70] Jhanji S, Goyal E, Chumber M, et al. Exploring fine tuning between phytohormones and ROS signaling cascade in regulation of seed dormancy, germination and seedling development[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024: 108352.
- [71] Iglesias-Fernández R, Matilla A J. Genes involved in ethylene and gibberellins metabolism are required for endosperm-limited germination of *Sisymbrium officinale* L. seeds: germination in *Sisymbrium officinale* L. seeds[J]. Planta, 2010, 231: 653-664.
- [72] Zhong C, Patra B, Tang Y, et al. A transcriptional hub integrating gibberellin–brassinosteroid signals to promote seed germination in *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(13): 4708-4720.
- [73] Moustafa-Farag M, Mahmoud A, Arnao M B, et al. Melatonin-induced Water Stress Tolerance in Plants: Recent Advances[J]. Antioxidants, 2020, 9(9):809.

-
- [74] Hwang O J, Back K. Exogenous Gibberellin Treatment Enhances Melatonin Synthesis for Melatonin-Enriched Rice Production[J]. *Biomolecules*, 2022, 12.
- [75] 孟想. 青稞褪黑素富集工艺及其相关基因表达分析[D]. 安徽工程大学, 2021.
- [76] 李萍, 郭发平, 田敏等. 甾醇在调节植物生长发育中的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(07): 90-98.
- [77] Zhang G Q, Yan Y Y, Zeng X Q, et al. Quantitative proteomics analysis reveals proteins associated with high melatonin content in barley seeds under NaCl-induced salt stress[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(27): 8492-8510.
- [78] Hwang O J, Back K. Molecular regulation of antioxidant melatonin biosynthesis by brassinosteroid acting as an endogenous elicitor of melatonin induction in rice seedlings[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(5): 918.
- [79] 宋松泉, 唐翠芳, 雷华平等. 种子休眠与萌发调控的研究进展[J]. *作物学报*, 2024, 50(01): 1-15.
- [80] Corbineau F, Xia Q, Bailly C, & El-Maarouf-Bouteau H. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 125-130.
- [81] Kołodziejczyk I, Kaźmierczak A. Melatonin—This is important to know[J]. *Science of The Total Environment*, 2024: 170871.
- [82] Hu W, Yang H, Tie W, et al. Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(46): 9987-9994.
- [83] Hu H, Luo S, An R, et al. Endogenous melatonin delays sepal senescence and extends the storage life of broccoli florets by decreasing ethylene biosynthesis[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 188: 111894.
- [84] Francoz E, Lepiniec L, North H M. Seed coats as an alternative molecular factory: thinking outside the box[J]. *Plant Reproduction*, 2018, 31: 327-342.
- [85] Sajeev N, Koornneef M, Bentsink L. A commitment for life: Decades of unraveling the molecular mechanisms behind seed dormancy and germination[J].

- The Plant Cell, 2024: 1-19.
- [86] Sharif R, Xie C, Zhang H, et al. Melatonin and its effects on plant systems[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2352.
- [87] Ruirong P, Hassane Hamadou A, Xu B. Germination in improving the nutrition, health benefits and processing of highland barley[J]. International Journal of Food Science & Technology.
- [88] Yang P M, Yang R J, He S T. Improving photosynthesis and the ascorbate-glutathione cycle of own-root and grafted-root chrysanthemums by brassinolide under drought stress[J]. Horticultural Science, 2024.
- [89] Sun S, Yao X, Liu X, et al. Brassinolide can improve drought tolerance of maize seedlings under drought stress: By inducing the photosynthetic performance, antioxidant capacity and ZmMYB gene expression of maize seedlings[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2022, 22(2): 2092-2104.
- [90] Ye K, Shen W, Zhao Y. External application of brassinolide enhances cold resistance of tea plants (*Camellia sinensis* L.) by integrating calcium signals[J]. Planta, 2023, 258(6): 114.
- [91] El-Mashad A A A, Mohamed H I. Brassinolide alleviates salt stress and increases antioxidant activity of cowpea plants (*Vigna sinensis*)[J]. Protoplasma, 2012, 249: 625-635.
- [92] 周伟江, 吴旺斌, 唐才宝等. 外源油菜素内酯对低温胁迫下水稻幼苗生长及生理特性的影响[J]. 西北农业学报, 2020, 29(09): 1410-1416.
- [93] Qian M, Enguo W, Honglu W, et al. Exogenous 24-epibrassinolide boosts plant growth under alkaline stress from physiological and transcriptomic perspectives: The case of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 248: 114298-114298.
- [94] T/QAS 076-2022. 青稞中直链淀粉和支链淀粉的含量测定 双波长分光光度法[S]. 青海: 青海省标准化协会, 2022.
- [95] 徐宁莉, 陶瑾, 张莉方等. 硫酸锌胁迫对萌发青稞功能成分及抗氧化能力的影响[J/OL]. 食品与发酵工业: 1-11[2024-03-24].

- [96] Shen Y B, Hu C R, Jiang H, et al. Characteristics of three typical Chinese highland barley varieties: phenolic compounds and antioxidant activities[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2018, 42(2): 12488
- [97] 李忠光, 龚明. 植物生理学综合性和设计性实验教程[M]. 华中科技大学出版社, 2014.
- [98] Ma M, Gu Z, Cheng L, et al. Effect of hydrocolloids on starch digestion: A review[J]. *Food Chemistry*, 2024: 138636.
- [99] Zhang H, Li Z, Tian Y, et al. Interaction between barley β -glucan and corn starch and its effects on the in vitro digestion of starch[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2019, 141: 240-246.
- [100] Al-Ansi W, Zhang Y, Alkawry T A A, et al. Influence of germination on bread-making behaviors, functional and shelf-life properties, and overall quality of highland barley bread[J]. *Lwt*, 2022, 159: 113200.
- [101] Waleed A L A, Mahdi A A, Al-Maqtari Q A, et al. The potential improvements of naked barley pretreatments on GABA, β -glucan, and antioxidant properties[J]. *LWT*, 2020, 130: 109698.
- [102] 袁红梅, 郭文栋, 赵丽娟等. 外源油菜素内酯对 NaCl 胁迫下亚麻种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2019, 50(11): 11-16.
- [103] Pramai P, Thanasukarn P, Thongsook T, et al. Glutamate Decarboxylase (GAD) Extracted from Germinated Rice: Enzymatic Properties and Its Application in Soymilk[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2019, 65(Supplement): S166-S170.
- [104] Nejad-Alimoradi F, Nasibi F, Kalantari K. 24-epibrassinolide pre-treatment alleviates the salt-induced deleterious effects in medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo*) by enhancement of GABA content and enzymatic antioxidants[J]. *South African Journal of Botany*, 2019, 124(1): 11-117.
- [105] Xu Z, Lei P, Pang X, et al. Exogenous application of poly- γ -glutamic acid enhances stress defense in *Brassica napus* L. seedlings by inducing cross-talks between Ca^{2+} , H_2O_2 , brassinolide, and jasmonic acid in leaves[J]. *Plant*

- Physiology and Biochemistry, 2017, 118: 460-470.
- [106] Martens S, Axel Mithöfer. Flavones and flavone synthases[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(20): 2399-2407.
- [107] Xi Z M, Zhang Z W, Huo S S, et al. Regulating the secondary metabolism in grape berry using exogenous 24-epibrassinolide for enhanced phenolics content and antioxidant capacity[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 3056-3065.
- [108] 孙嘉华, 陈可钦, 郑秋玲等. 24-表油菜素内酯对不同香型葡萄果实品质的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2024, 52(03): 81-94+7.
- [109] Zheng J, An Y, Wang L. 24-Epibrassinolide enhances 5-ALA-induced anthocyanin and flavonol accumulation in calli of 'Fuji' apple flesh[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2018, 134: 319-330.
- [110] Vardhini B V. Modifications of morphological and anatomical characteristics of plants by application of brassinosteroids under various abiotic stress conditions-A review[J]. *Plant Gene*, 2017, 11: 70-89.
- [111] Wu L Y, Yang H Q. Combined Application of Carboxymethyl Chitosan Coating and Brassinolide Maintains the Postharvest Quality and Shelf Life of Green Asparagus[J]. *Journal of Food Processing & Preservation*, 2016, 40(2): 154-165.
- [112] Xue J, Guo C, Shen Y, et al. Brassinolide soaking and preharvest UV-B radiation influence the shelf life of small black bean sprouts[J]. *Food Chemistry*, 2021(1): 129322.
- [113] Waleed A L A, Mahdi A A, Al-Maqtari Q A, et al. Characterization of molecular, physicochemical, and morphological properties of starch isolated from germinated highland barley[J]. *Food Bioscience*, 2021, 42: 101052.
- [114] Guo C, Li J, Li M, et al. Regulation mechanism of exogenous brassinolide on bulbil formation and development in *Pinellia ternata*[J]. *Frontiers in plant science*, 2022, 12: 809769.
- [115] Zhao X, Ma K, Li Z, et al. Transcriptome analysis reveals brassinolide signaling pathway control of foxtail millet seedling starch and sucrose metabolism under freezing stress, with implications for growth and development[J]. *International*

- Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(14): 11590.
- [116] Zengin F. Physiological behavior of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings under metal stress[J]. Biological research, 2013, 46(1): 79-85.
- [117] Song J, Wang H, Chu R, et al. Differences in physiological characteristics, seed germination, and seedling establishment in response to salt stress between dimorphic seeds in the halophyte *Suaeda liaotungensis*[J]. Plants, 2023, 12(6): 1408.
- [118] Shu H, Ni W, Guo S, et al. Root-applied brassinolide can alleviate the NaCl injuries on cotton[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37: 1-11.
- [119] Ahammed G J, Choudhary S P, Chen S, et al. Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene–cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato[J]. Journal of experimental botany, 2013, 64(1): 199-213.
- [120] Shi H, Jiang C, Ye T, et al. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin[J]. Journal of experimental botany, 2015, 66(3): 681-694.
- [121] Cao Y, Du P, Ji J, et al. Ionomics combined with transcriptomic and metabolomic analyses to explore the mechanism underlying the effect of melatonin in relieving nutrient stress in apple[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 9855.
- [122] Hu Z, Fu Q, Zheng J, et al. Transcriptomic and metabolomic analyses reveal that melatonin promotes melon root development under copper stress by inhibiting jasmonic acid biosynthesis[J]. Horticulture Research, 2020, 7.

攻读硕士学位期间发表的学术论文

论文:

1. Li Z, Zhang G. Metabolomic analysis reveals the quality characteristics of Yi Gong tea leaves at different harvesting periods[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(12): e14478.
2. Wang Z, Zhang G, Zhang Z, & Li, Z. Target Metabolome and Transcriptome Analysis Reveal Molecular Mechanism Associated with Changes of Tea Quality at Different Development Stages[J]. Molecular Biotechnology, 2023, 65(1): 52-60.

致谢

三年研学，如白驹过隙，所遇皆为人生财富，目之所及，皆是回忆，纵心中五味杂陈，仍心怀感激。

饮水思其源，成学念吾师。首先要感谢我的导师张国强教授，感谢他三年来对我的谆谆教导，感谢他在论文的选题以及论文的完成过程中给予我中肯的专业建议，感谢他在传授我酿酒专业技能的同时培养我的专业素养能力。在此，我要再次由衷的感谢张老师在学术指导、思想启发以及生活关怀等方面的帮助。其次，我要感谢在这三年中其他帮助过我的其他老师们，您们帮助我收获了这获益匪浅的三年，承蒙教诲，一刻不忘。祝我导张老师以及各位老师未来万事顺意，身体健康。

人海茫茫，庆幸相遇。很幸运在三年实验室时光能够结识到一群有点抽象但却很可爱的朋友们。感谢朱大师兄在我学习以及生活上给予的很多帮助，以及感谢徐宁莉师姐、陶瑾师姐以及张莉方师姐在实验以及学习上对我的帮助；同时还要感谢同门郭玉峰、廖薛羿，室友韩振兴、曹宇凡，师弟孙武、姜心豪，师妹马明欣、黄杰、宁方方，希望各位在未来都能得偿所愿，心想事成。

写尽千山，落笔给自己。最后我要感谢那个经常办事拖延，经常对前路感到迷茫却又第二天醒来继续坚持下去的自己。心若有往之，何惧道阻长，希望在接下来新的人生阶段，你能够保持热忱，坚定下去。

长路漫漫，江湖再见。